

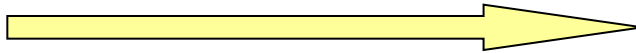
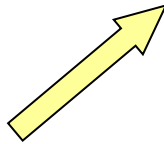
# Exprimované geny a přírodní selekce

Produkty funkčních genů a  
jejich význam v ekologických  
studiích



# Geny a adaptace

- studium selekčních tlaků daných prostředím a evoluční odpovědi na ně → vznik **adaptací**, tj. **geneticky** podmíněné přizpůsobení se prostředí (vs. fenotypová plasticita)
- např. interakce s abiotickým prostředím



# Proč geny v molekulární ekologii?

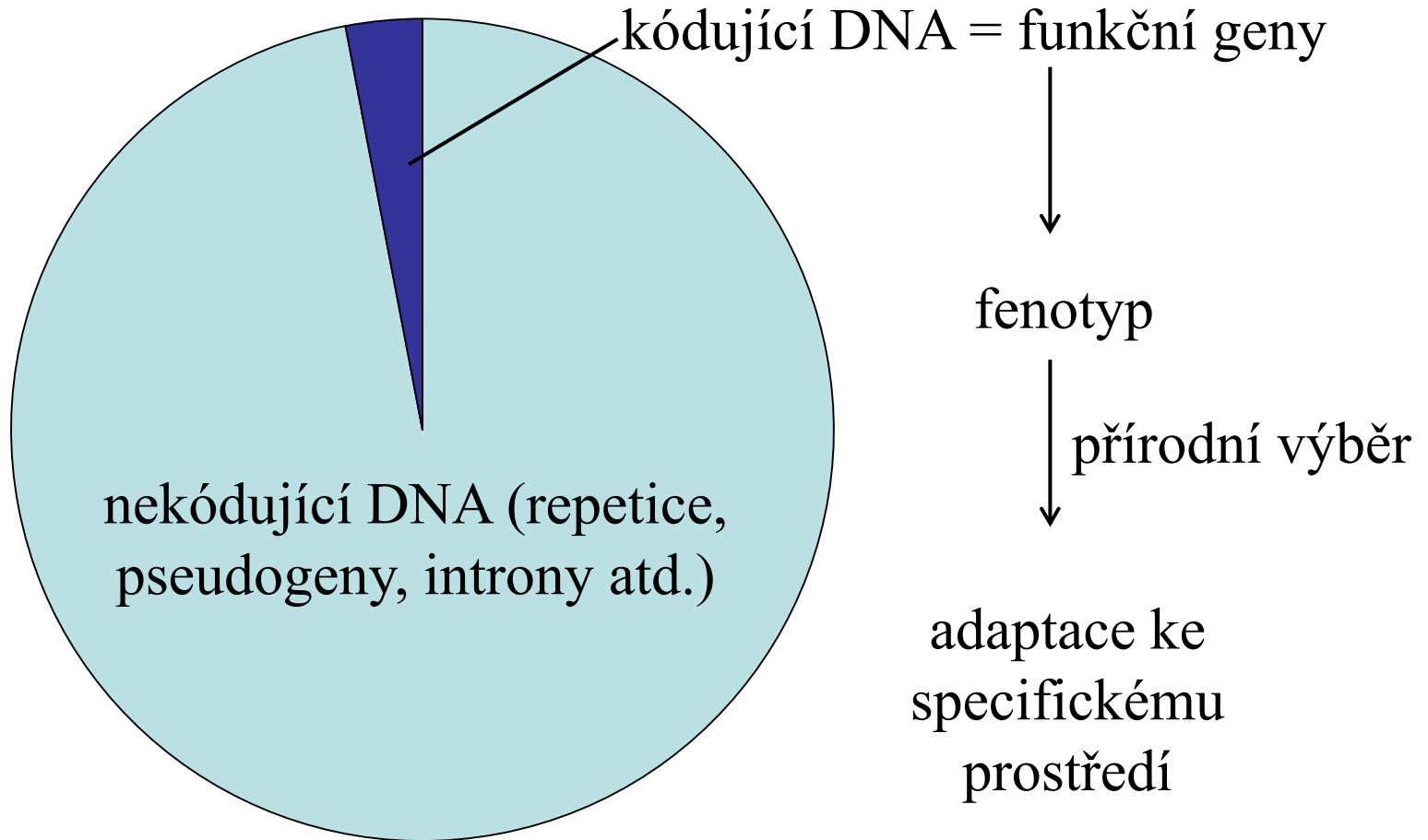
- Geny mají funkční význam - geneticky determinovaný polymorfismus
- -> studium **proximálních mechanismů**



- **Př.: Proč je samec hýla rudého červeně zbarven?**
- **ultimátní vysvětlení** - aby se líbil samicím a zplodil s nimi více potomků
- **proximátní vysvětlení** - protože karotenoidy získané z potravy ukládá více do peří a méně je používá v imunitní odpovědi (protože má dobré geny)

# *Funkční vs. neutrální genetická variabilita*

---



97% lidské DNA nic nekóduje!!!

# Jak relevantní je informace získaná z genetických dat

---

Příklad: 10 microsatelitů  
„neutrální znaky“

✓ populačně-  
genetická struktura

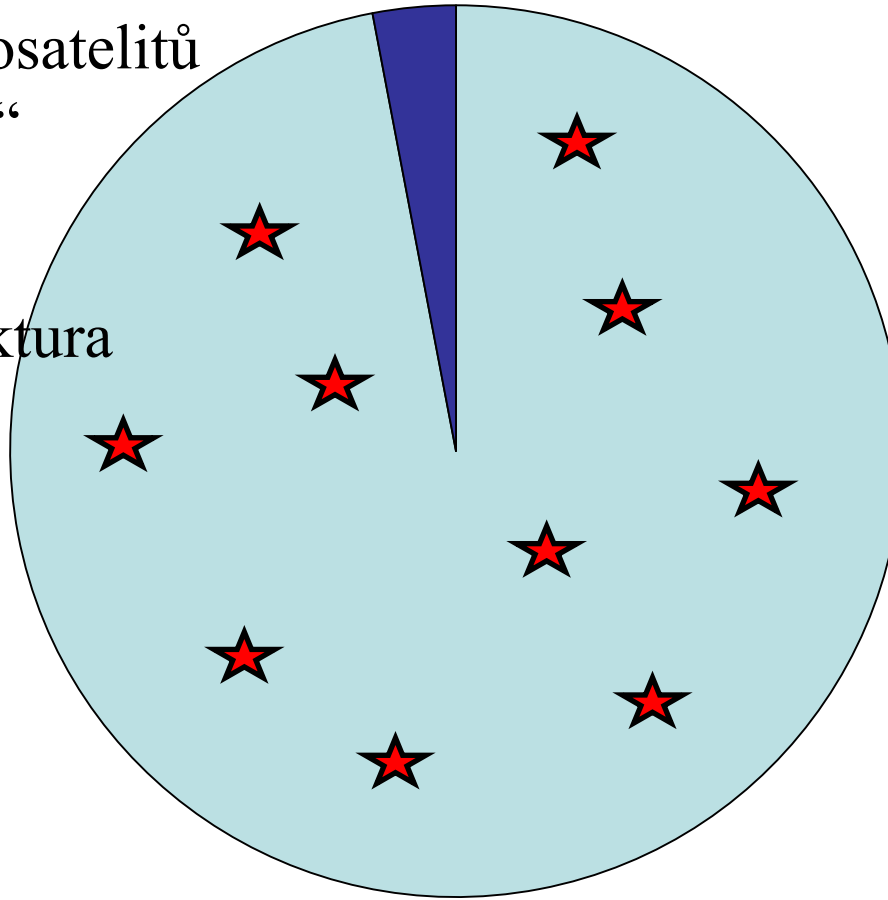
✓ inbreeding

✓ bottleneck

✗ adaptace

✗ přežívání

97% lidské DNA nic nekóduje!!!



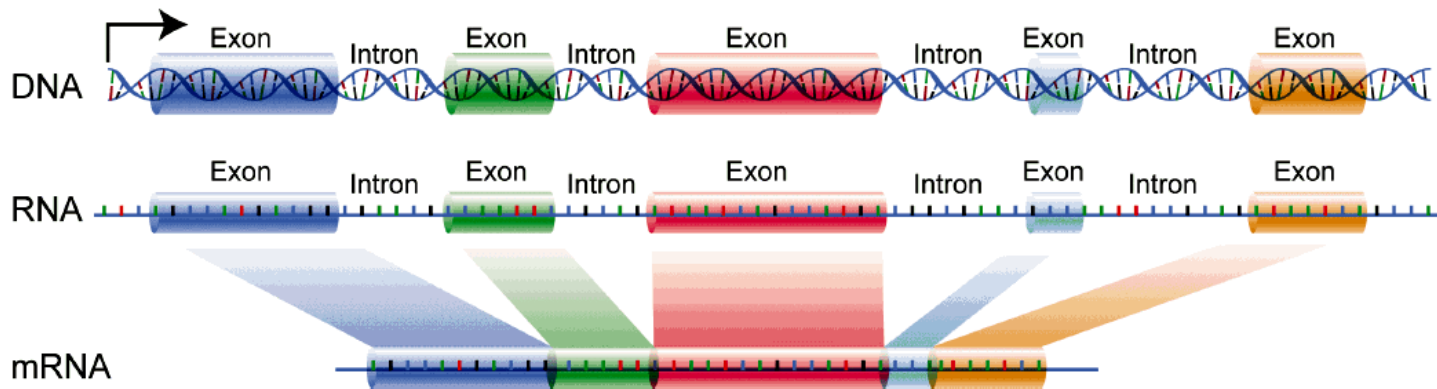
=



*a priori*  
neutrální k  
působení  
přírodního  
výběru

# Struktura genů

- Exons → protein coding, under selection
- Introns → non-coding, neutral
- Intergenic regions → non-coding, neutral



# Degenerovaný genetický kód

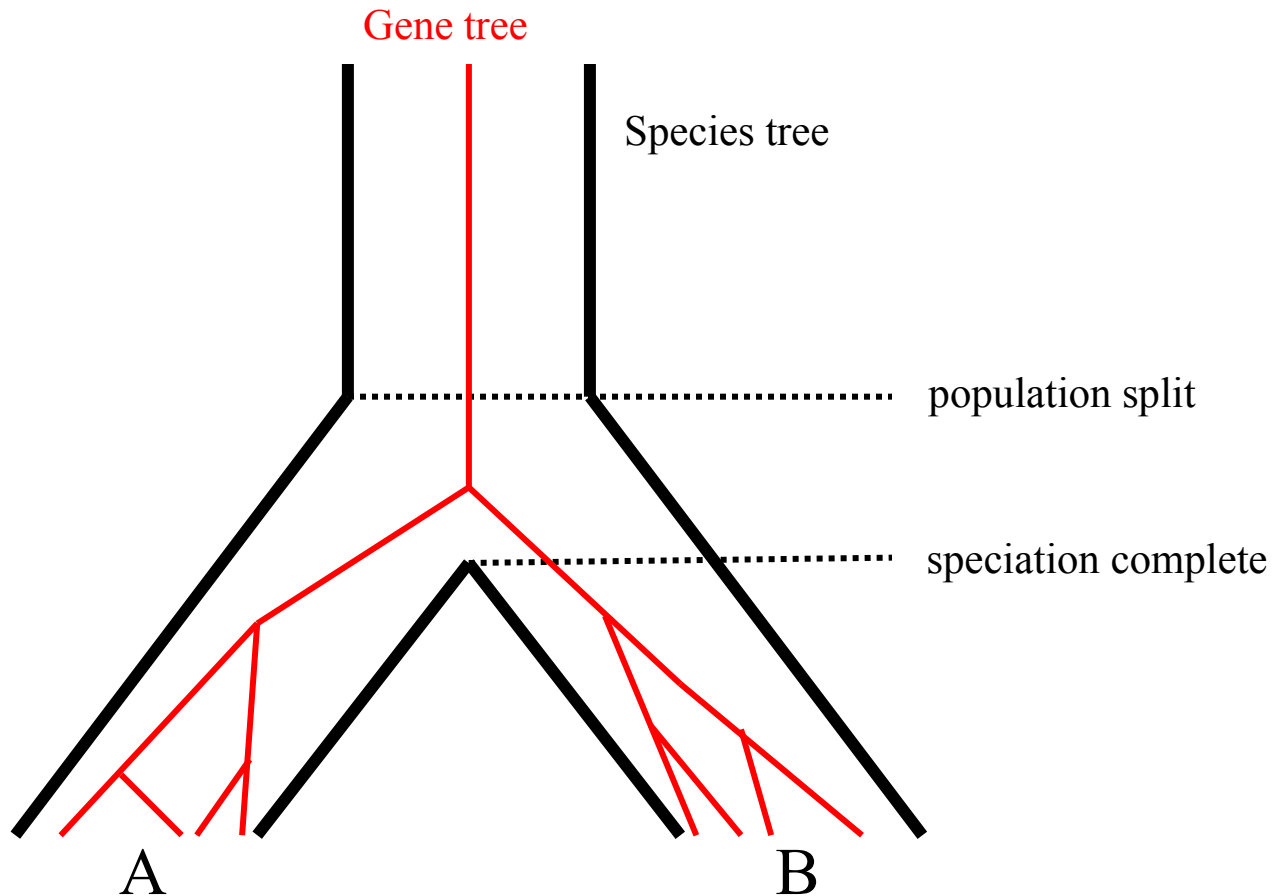
GCT	→	Alanine
GCA	→	Alanine
GCC	→	Alanine
GCG	→	Alanine
CCT	→	Proline
GGA	→	Glycine

→ 3rd position evolves neutrally

→ 1st and 2nd position under selection

# Studium selekce - fylogenetická analýza

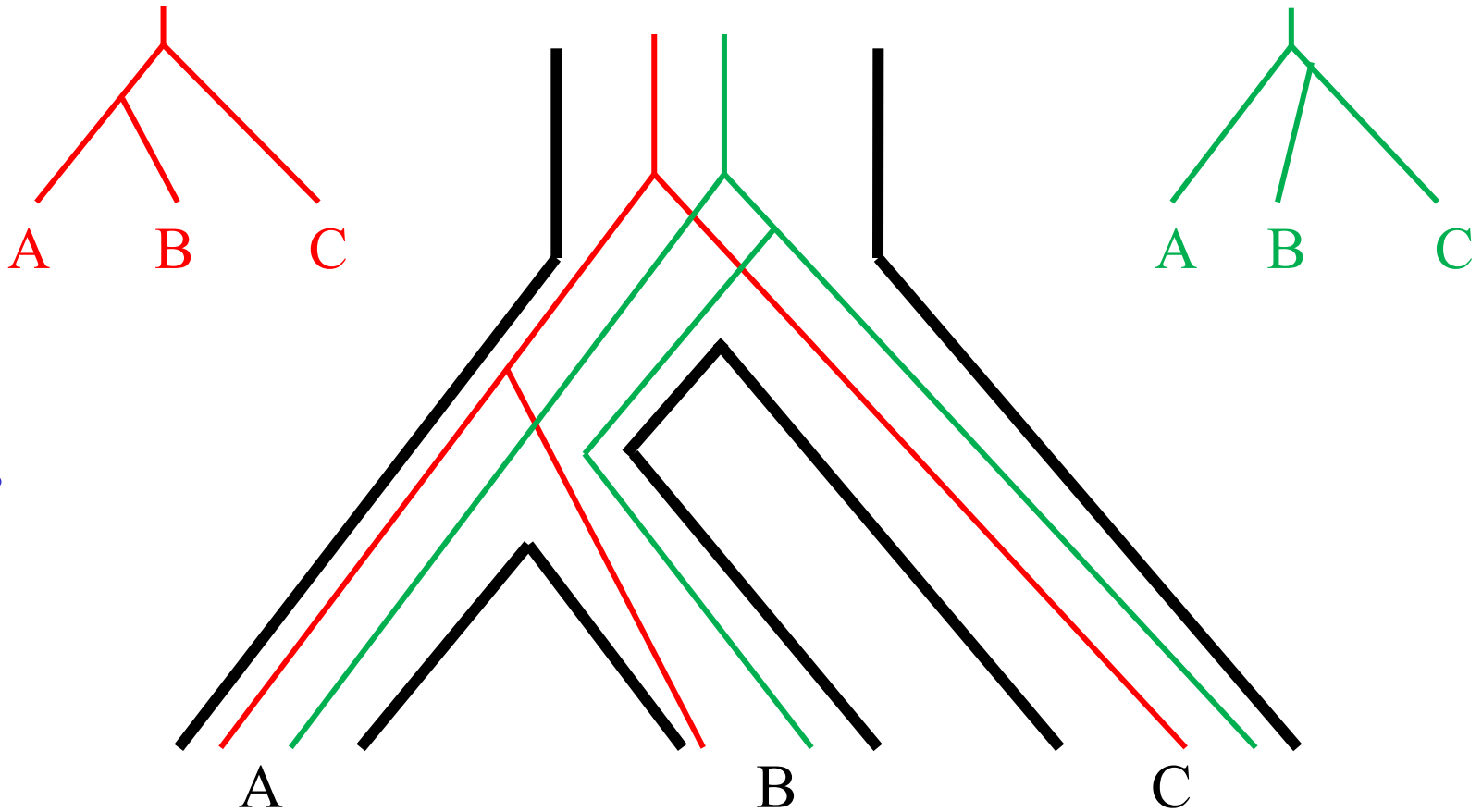
- Gene-tree versus species tree





# Species-trees

- Gene-tree versus species tree



# Studium selekce - fylogenetická analýza

## •Gene-trees & Selection: The case of C4 photosynthesis

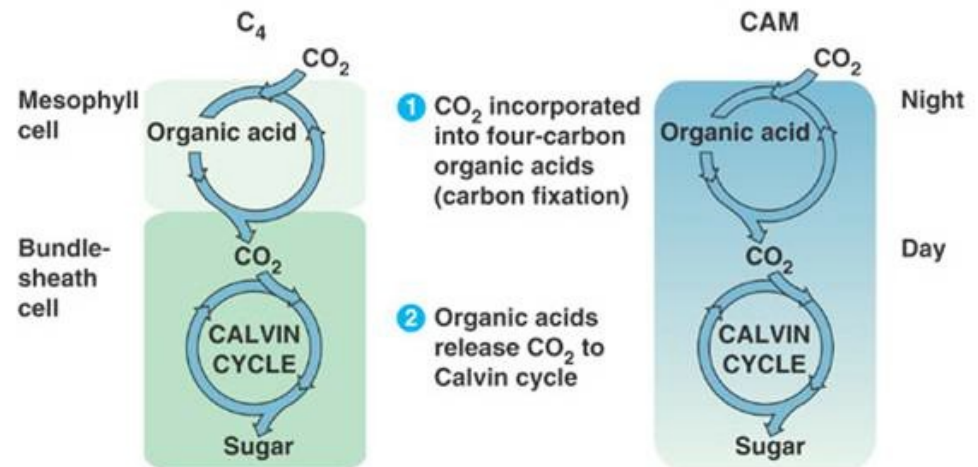
- Christin et al. 2007, Curr Biol
- PEPC* gene
- →C4 photosynthesis



Sugarcane



Pineapple

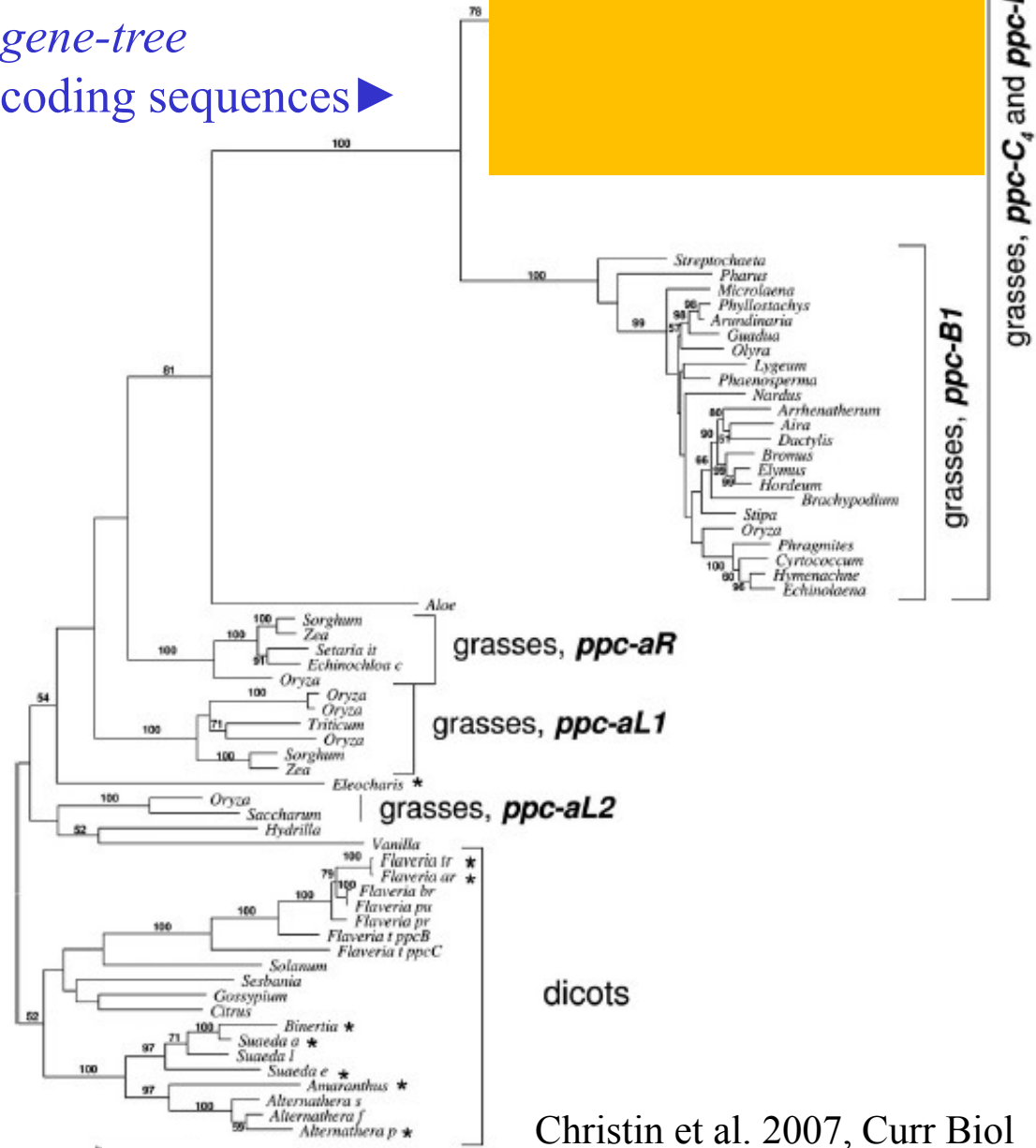


species-tree

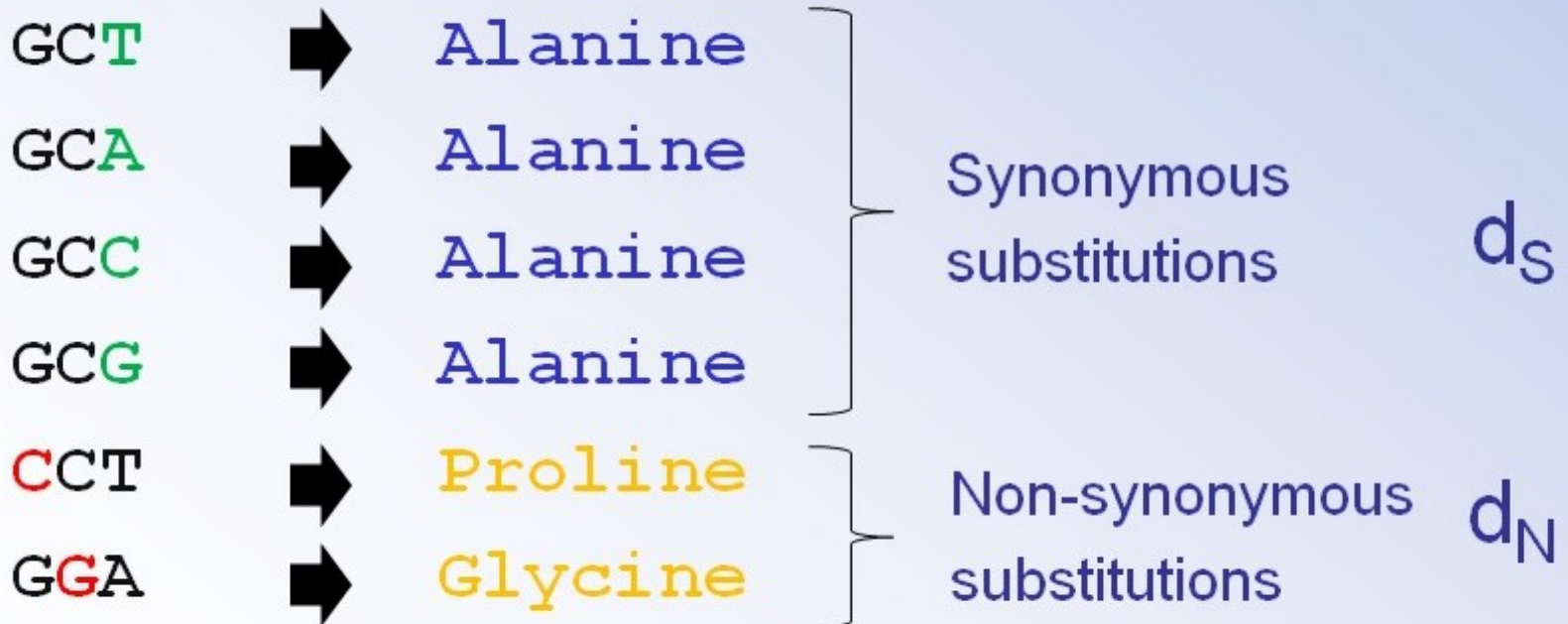
◀ intronic sequences

gene-tree

coding sequences ▶



# Selekce na úrovni sekvencí



# Selekcce na úrovni sekvencí

• Testing for selection:  $d_N/d_S$

$d_S$  Rate of synonymous substitutions, ‘neutral’ evolutionary rate

$d_N$  Rate of non-synonymous substitutions

•  $d_N/d_S = 1$  as many syn as non-syn substitutions  $\rightarrow$  neutral evolution

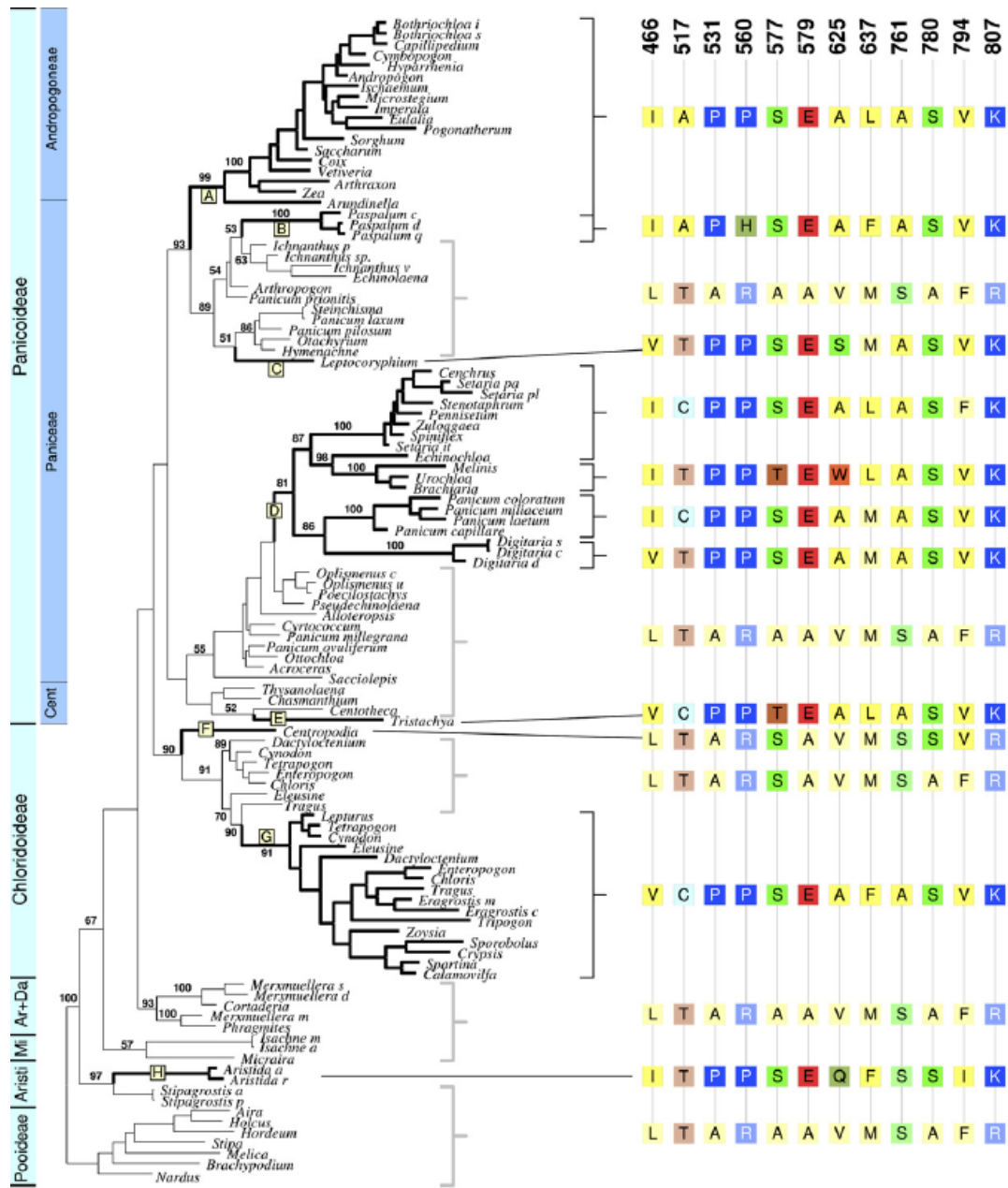
•  $d_N/d_S < 1$  less non-syn than syn substitutions  $\rightarrow$  purifying selection

•  $d_N/d_S > 1$  more non-syn than syn substitutions  $\rightarrow$  positive selection

◀ intronic sequences

coding sequences ▶  
without positively  
selected sites





PEPC gene

12 codons with  $d_N/d_S > 1$

Sequences of unrelated but ecologically similar species more similar at these positions than they are in related species.

→ convergent evolution!

# Metody studia funkční variability

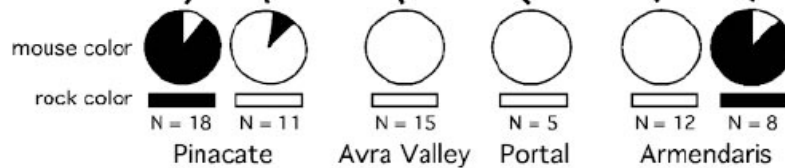
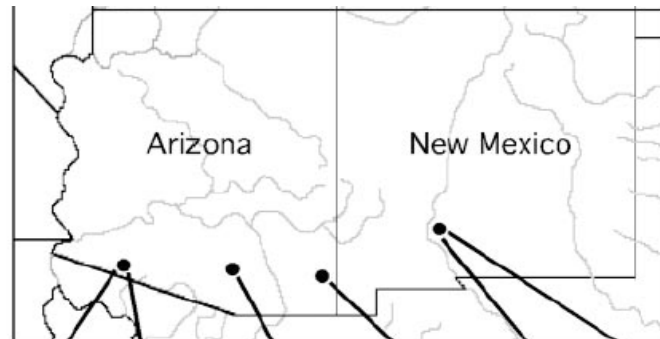
1. Sledování kandidátních genů
2. Genomické přístupy (mnoho genů najednou)



pytlouš

# *Chaetodipus intermedius*

Hoekstra, Nachman et al.



- Tmavé a světlé zbarvení
- Odpovídá barvě prostředí (tmavé zbarvení na lávě)

# Arizona

Korelace zbarvení s prostředím i na malé škále

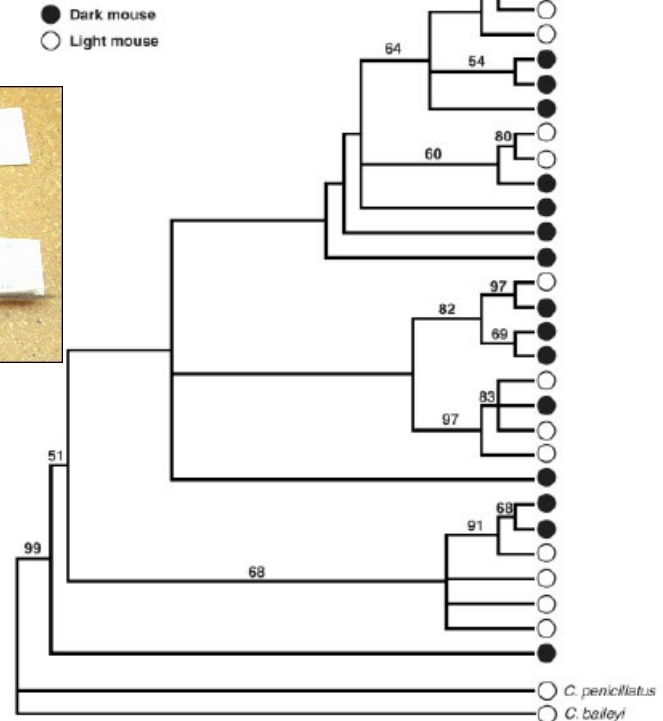
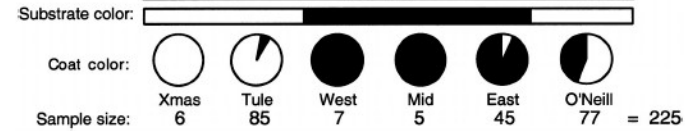
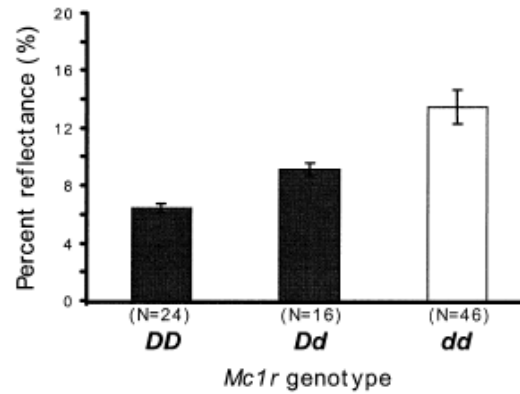
mtDNA nekoreluje se zbarvením

Sekvenování kandidátních genů (známých z inbredních myší)

melanocortin-1 receptor MC1R

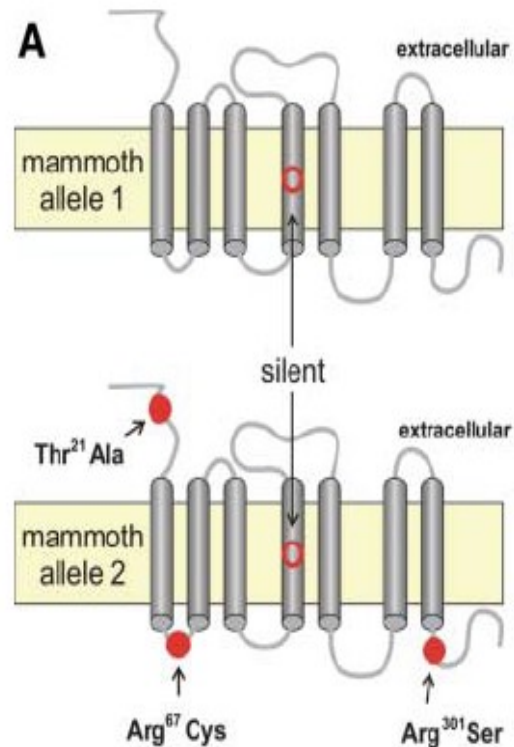
Záměna 4 aminokyselin

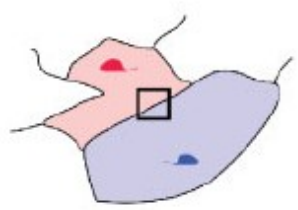
Jednoduchá dědičnost alel a zbarvení



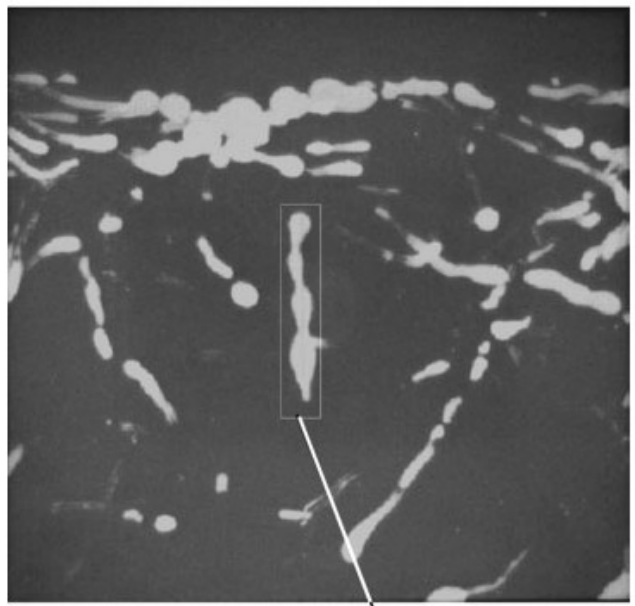
# MC1R u člověka, mamuta a dalších

- U člověka zrzavé vlasy a neschopnost se opálit
- Zbarvení krav, koňů a psů
- Výskyt dvou odlišných variant u mamutů

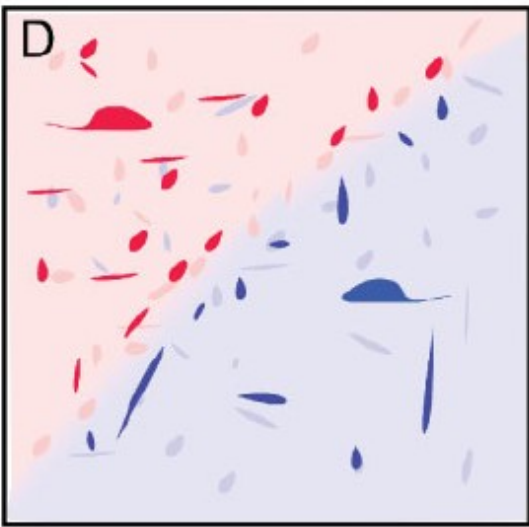
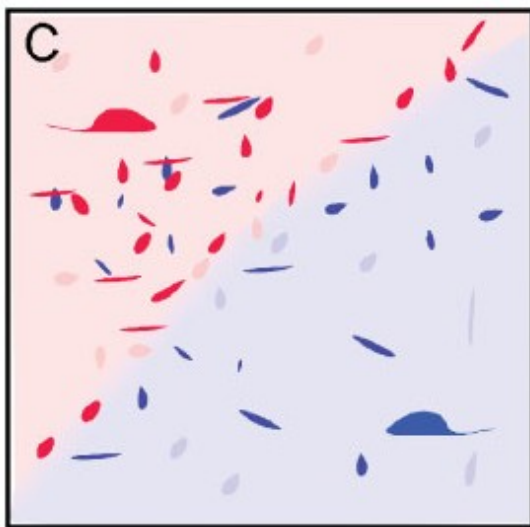
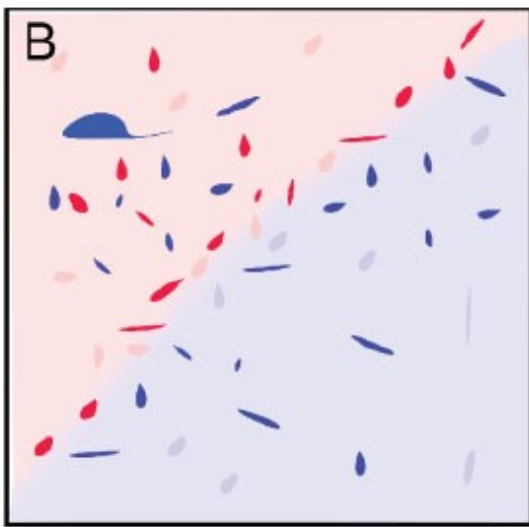
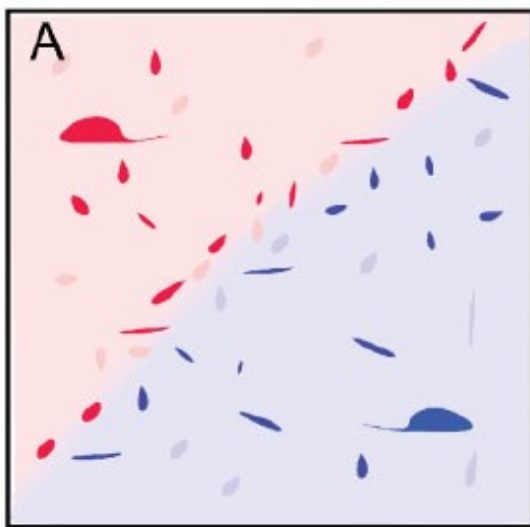




15cm



Urine streak presented as stimulus



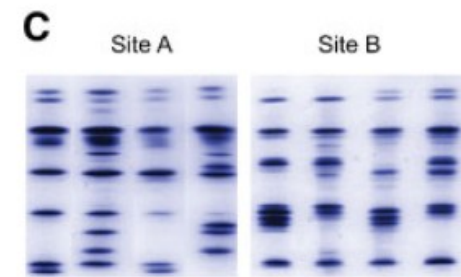
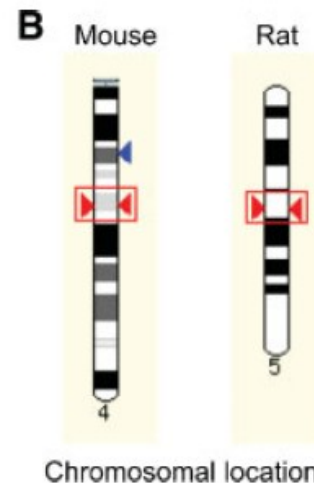
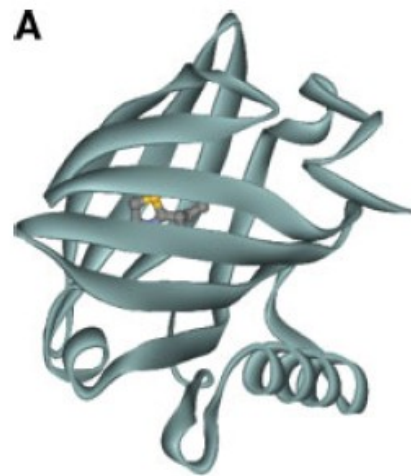
*Mus musculus*

Značení teritorií pachovými značkami (kapky moči)

Přeznačkování

V moči proteiny vážící volatilní molekuly

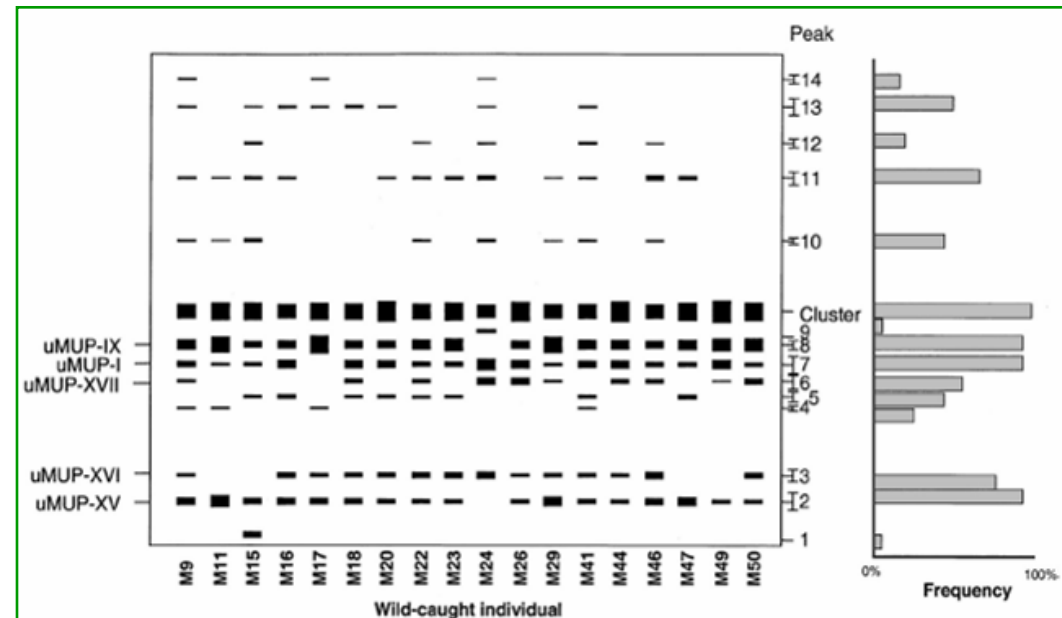
# MUPs



Urine samples from individual wild-caught male mice

Major Urinary Proteins - komplex velmi podobných genů

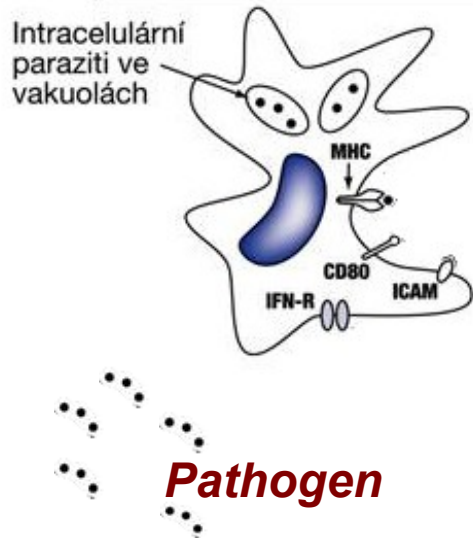
- Obtížně se studují (isoelektrická fokusace)
- Různé alely
- Navíc různá míra exprese
- → individuální profil
- Čárový kód jedince



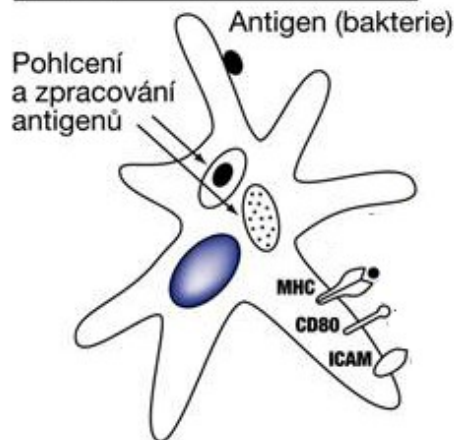
**Major histocompatibility complex (MHC)**

# Antigen-specifická imunitní odpověď

## INFIKOVANÝ MAKROFÁG

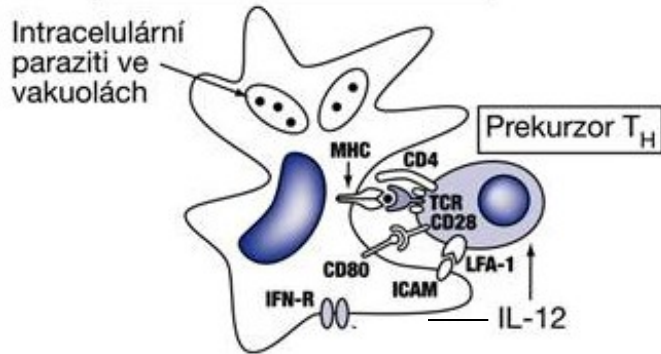


## APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)

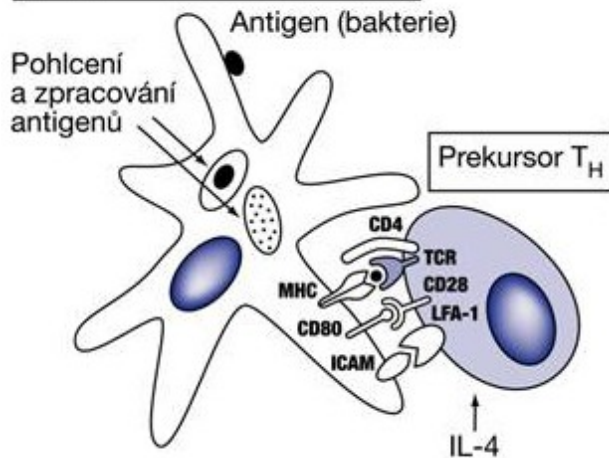


# Antigen-specifická imunitní odpověď

INFIKOVANÝ MAKROFÁG

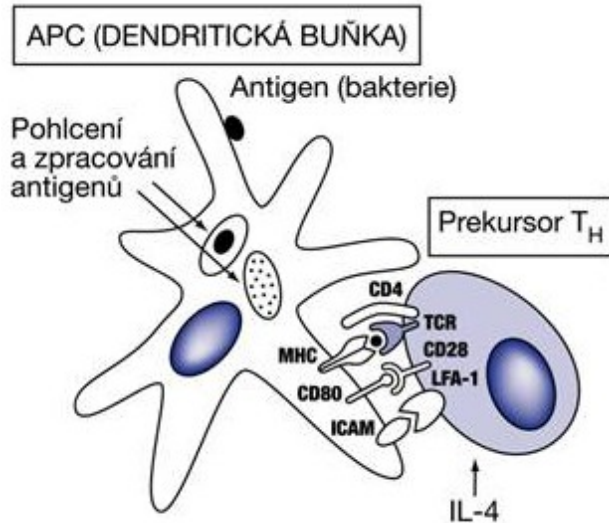
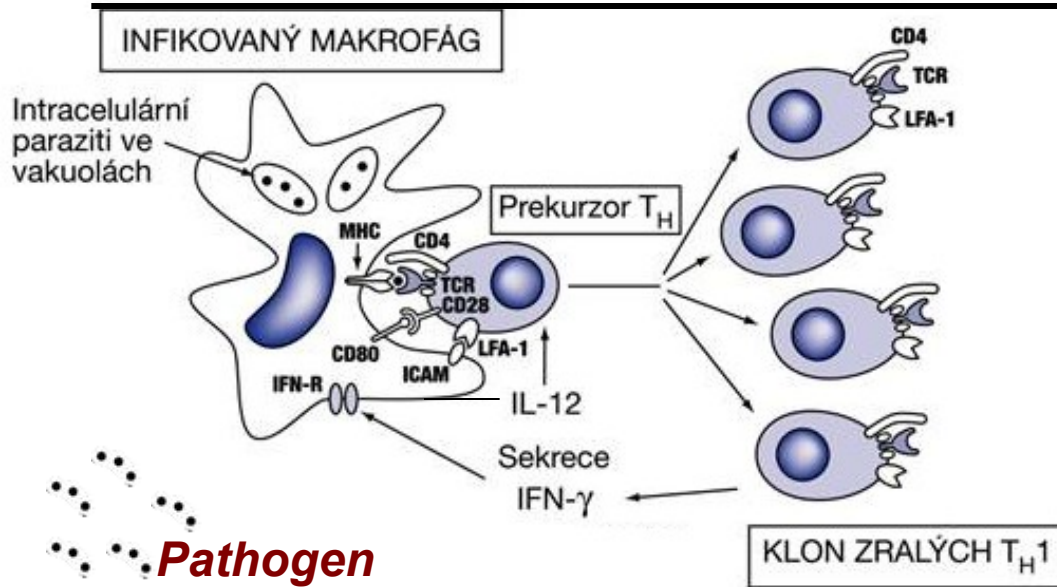


APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)

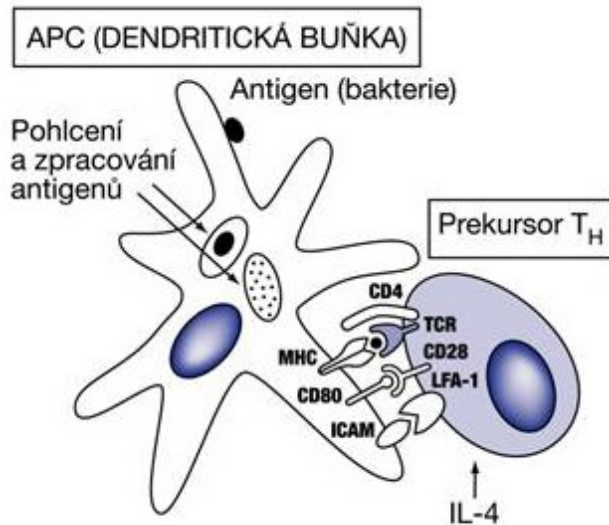
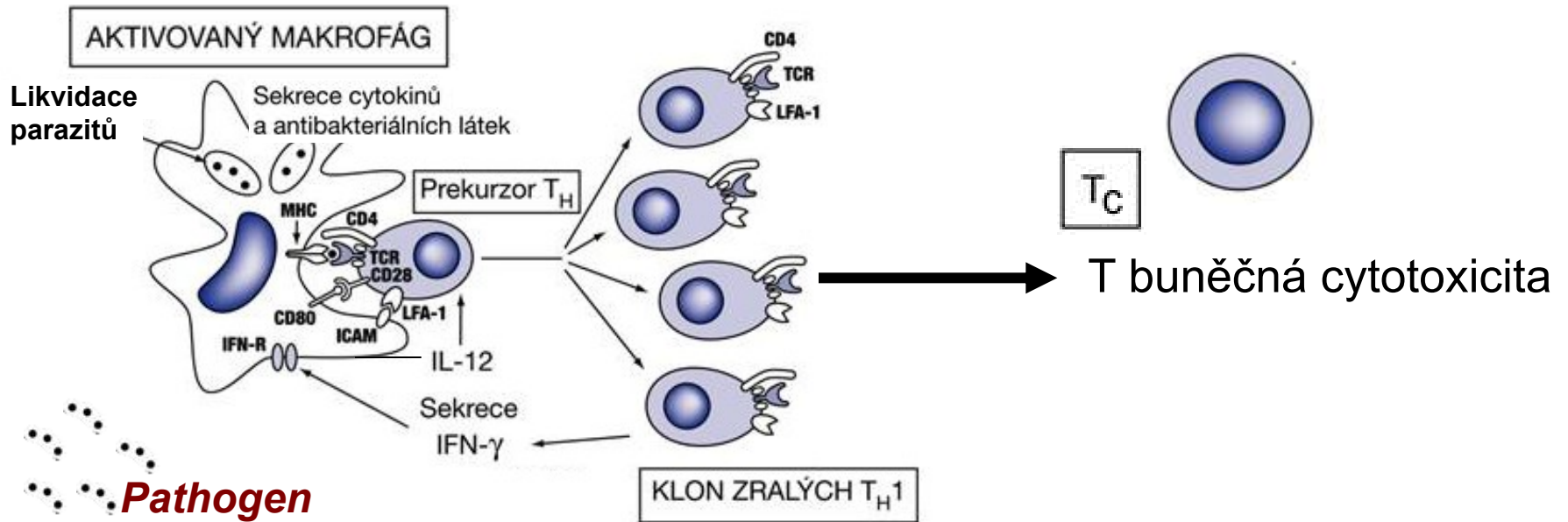




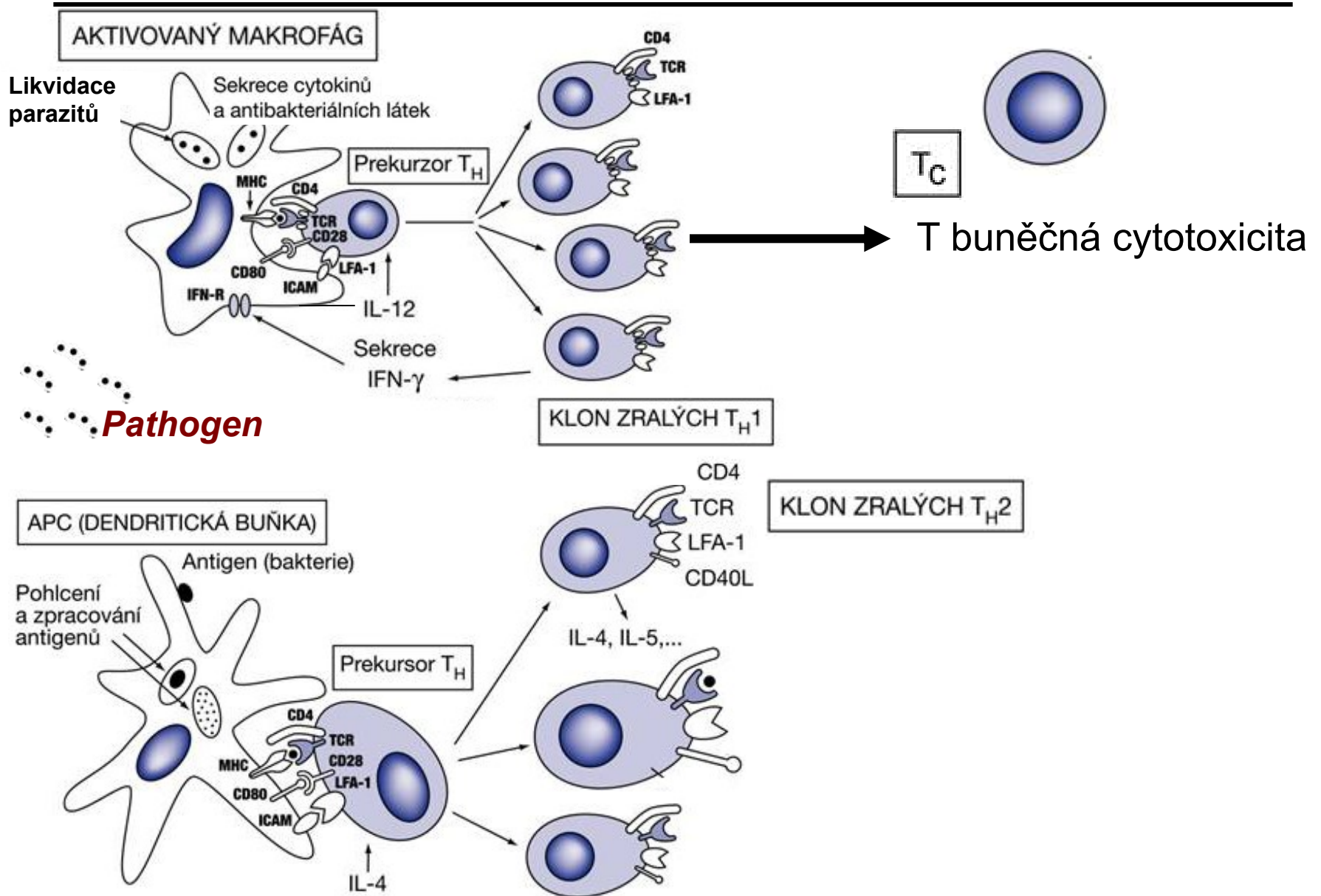
# Antigen-specifická imunitní odpověď



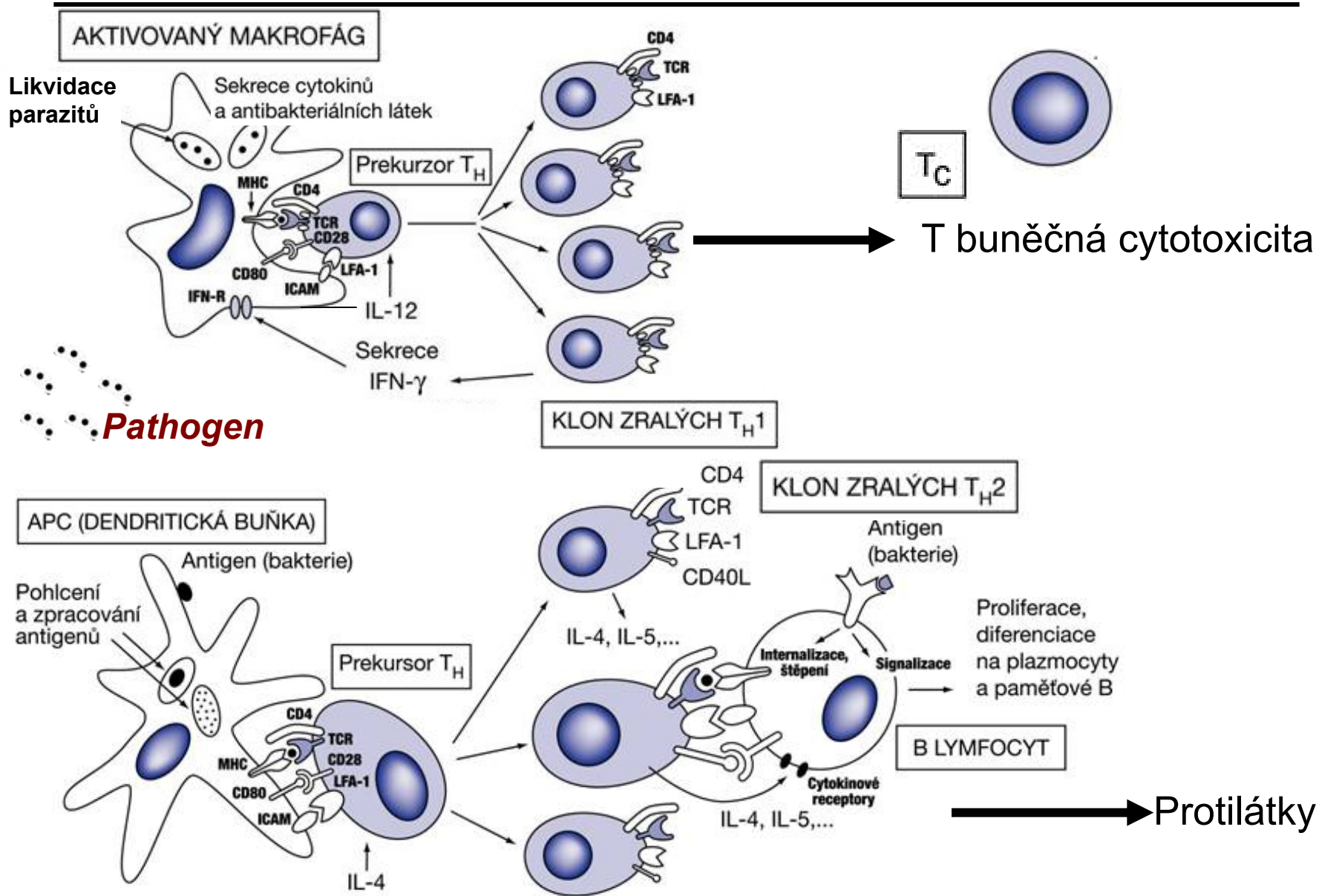
# Antigen-specifická imunitní odpověď



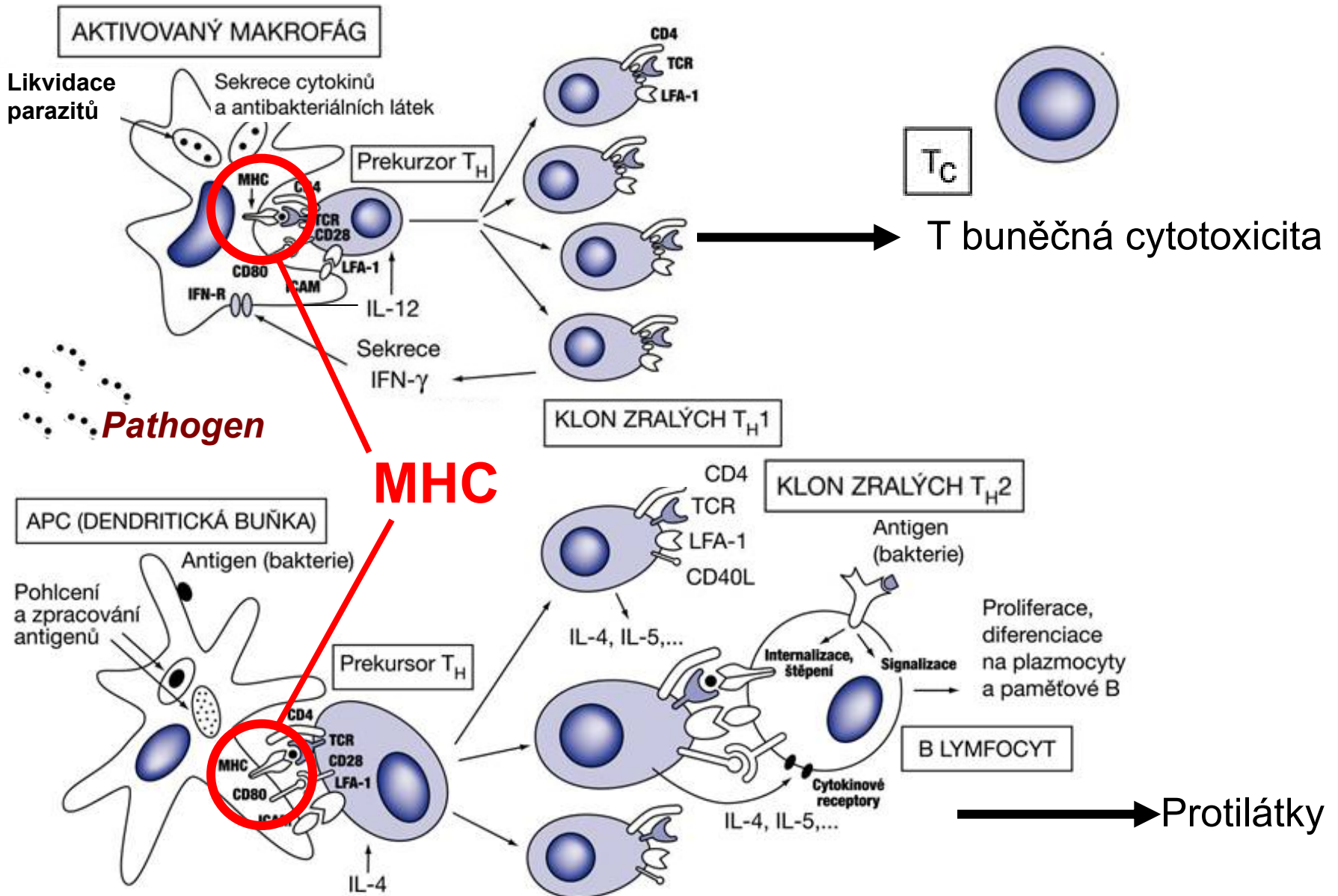
# Antigen-specifická imunitní odpověď



# Antigen-specifická imunitní odpověď

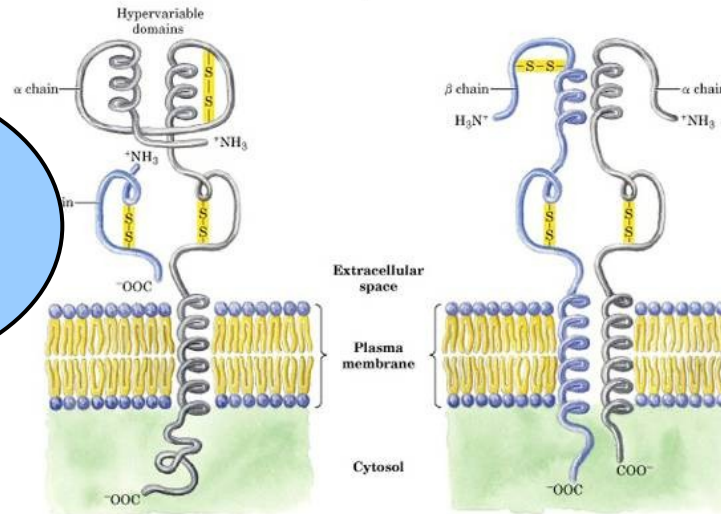


# Evoluční ekologie: Kdo a jak rozpozná parazita ?



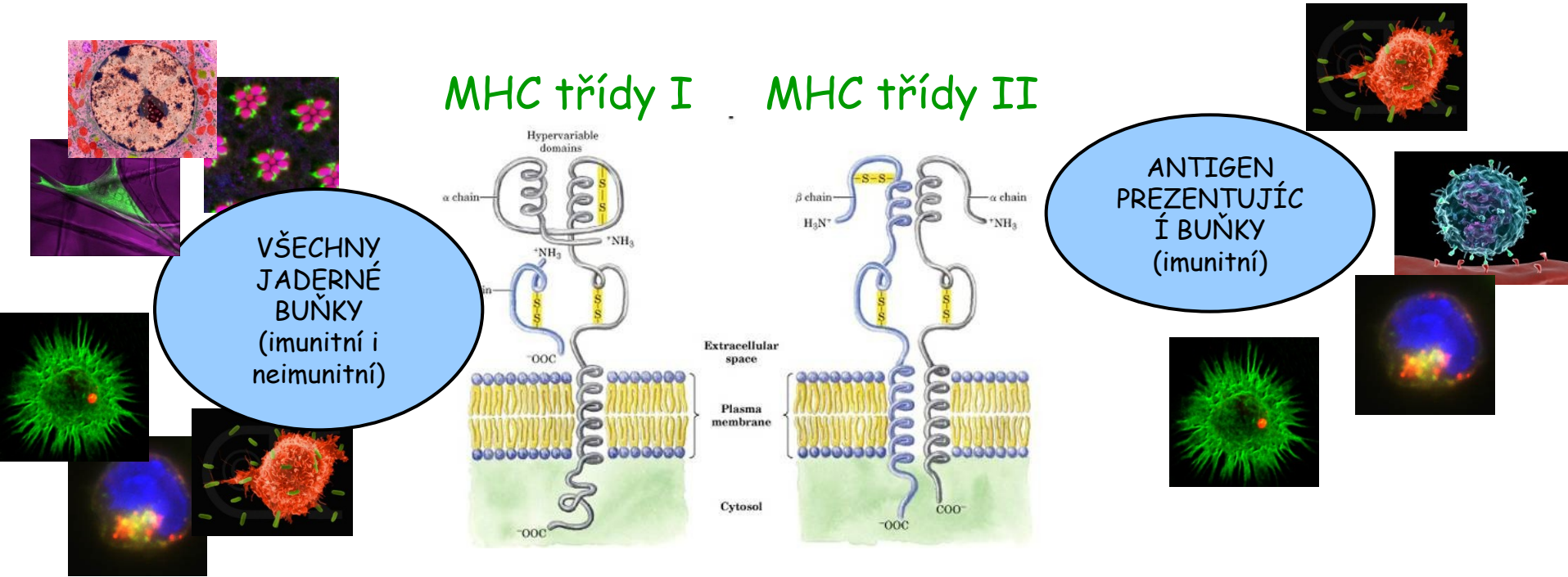
# Major histocompatibility complex (MHC)

## MHC třídy I      MHC třídy II



VŠECHNY  
JADERNÉ  
BUŇKY  
(imunitní i  
neimunitní)

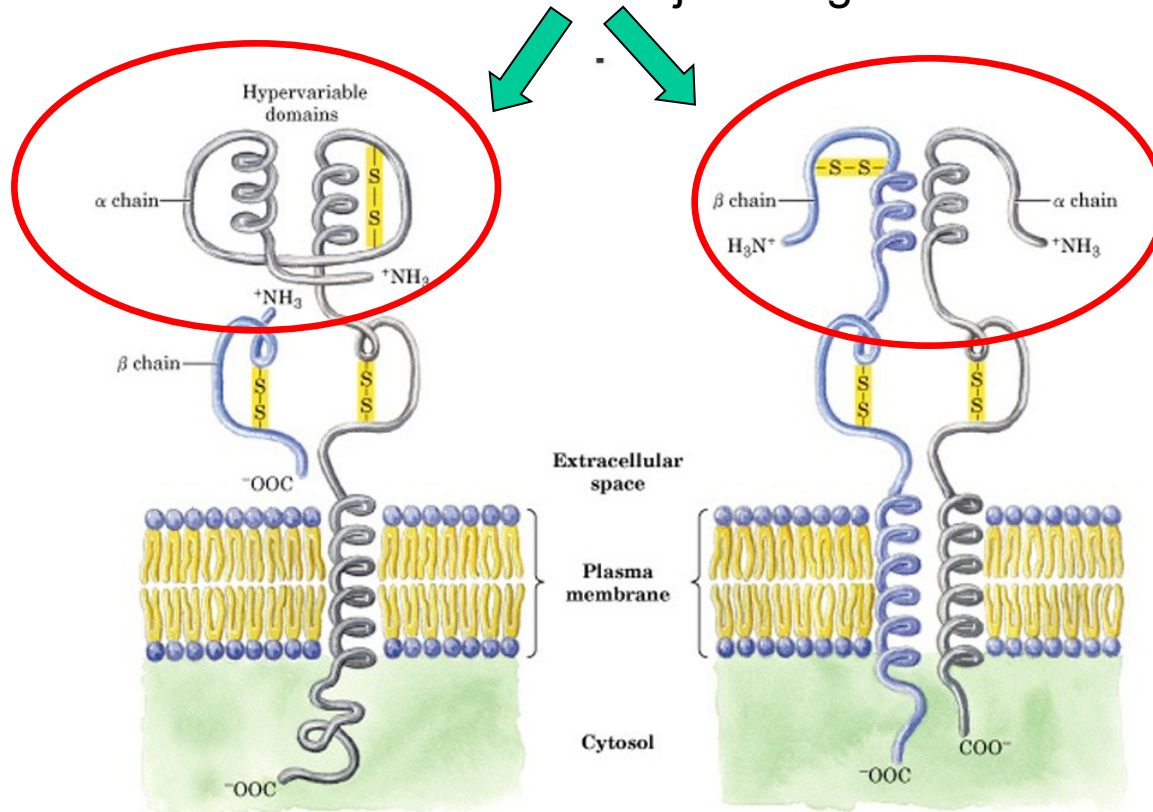
ANTIGEN  
PREZENTUJÍCÍ  
BUŇKY  
(imunitní)



# Major histocompatibility complex (MHC)

---

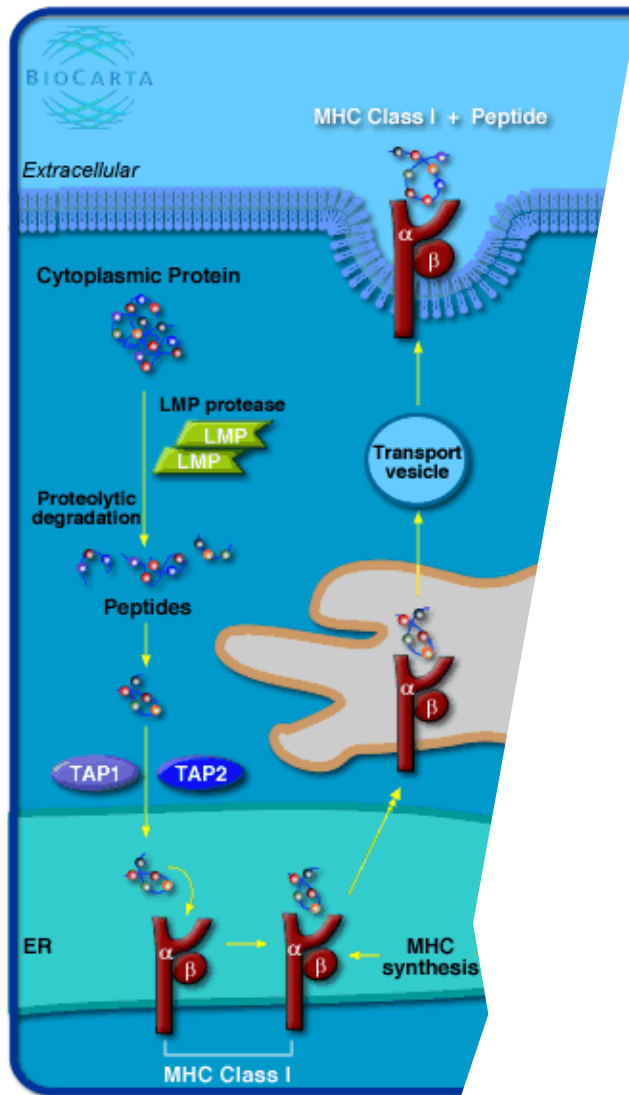
Oblast rozeznávající antigen



Class I

Class II

# *Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu*

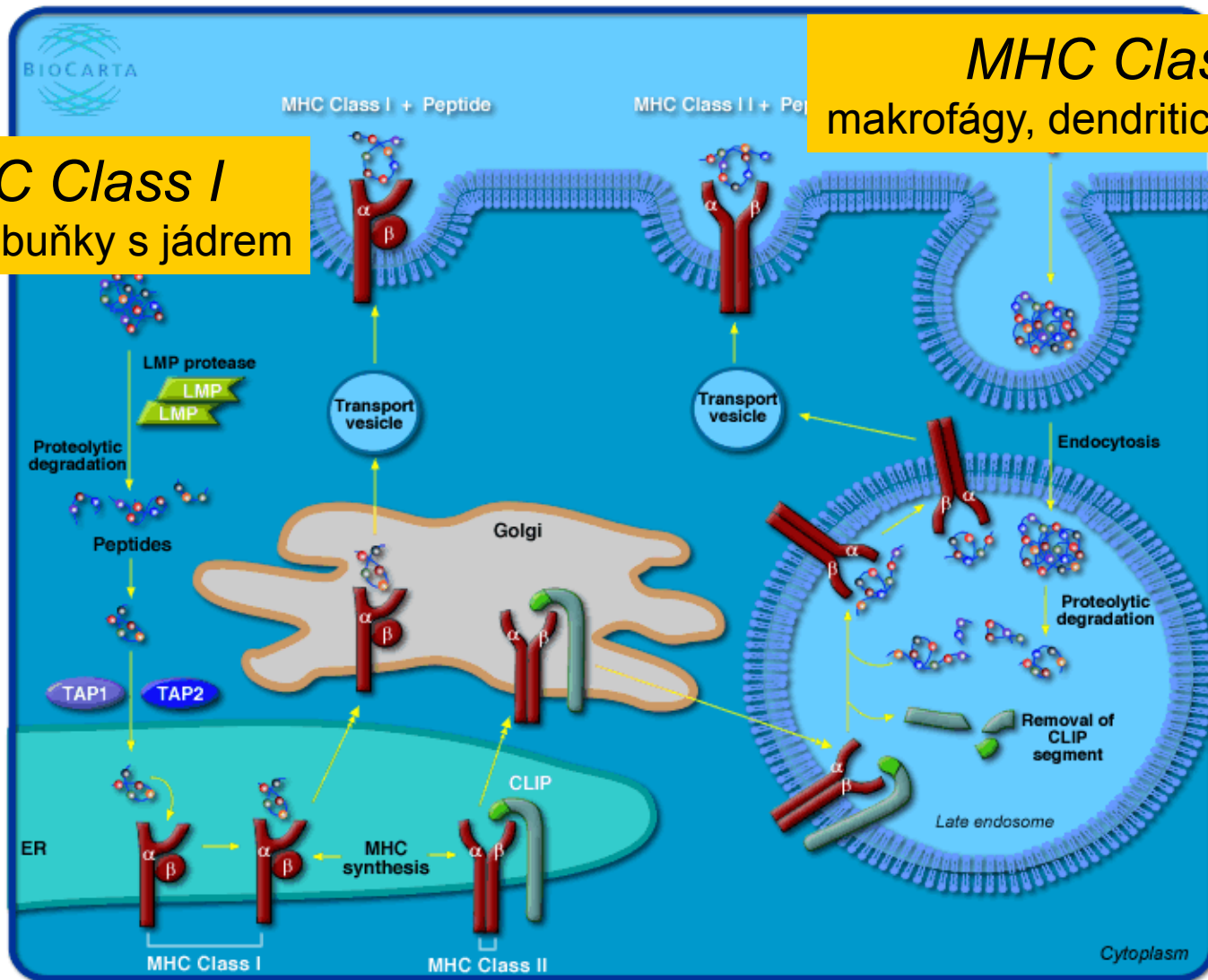




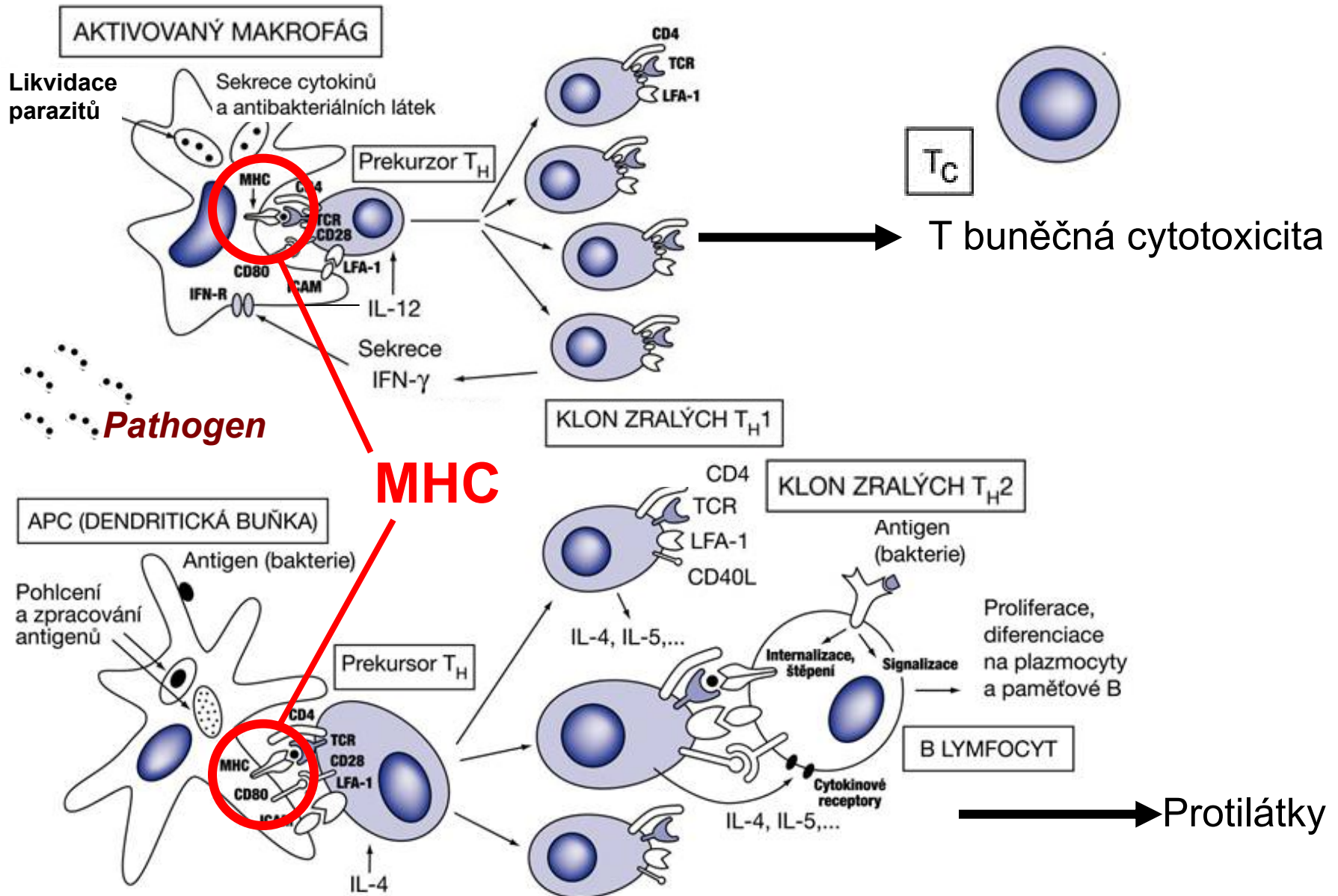
# Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu

**MHC Class I**  
všechny buňky s jádrem

**MHC Class II**  
makrofágy, dendritické buňky aj.



# Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď

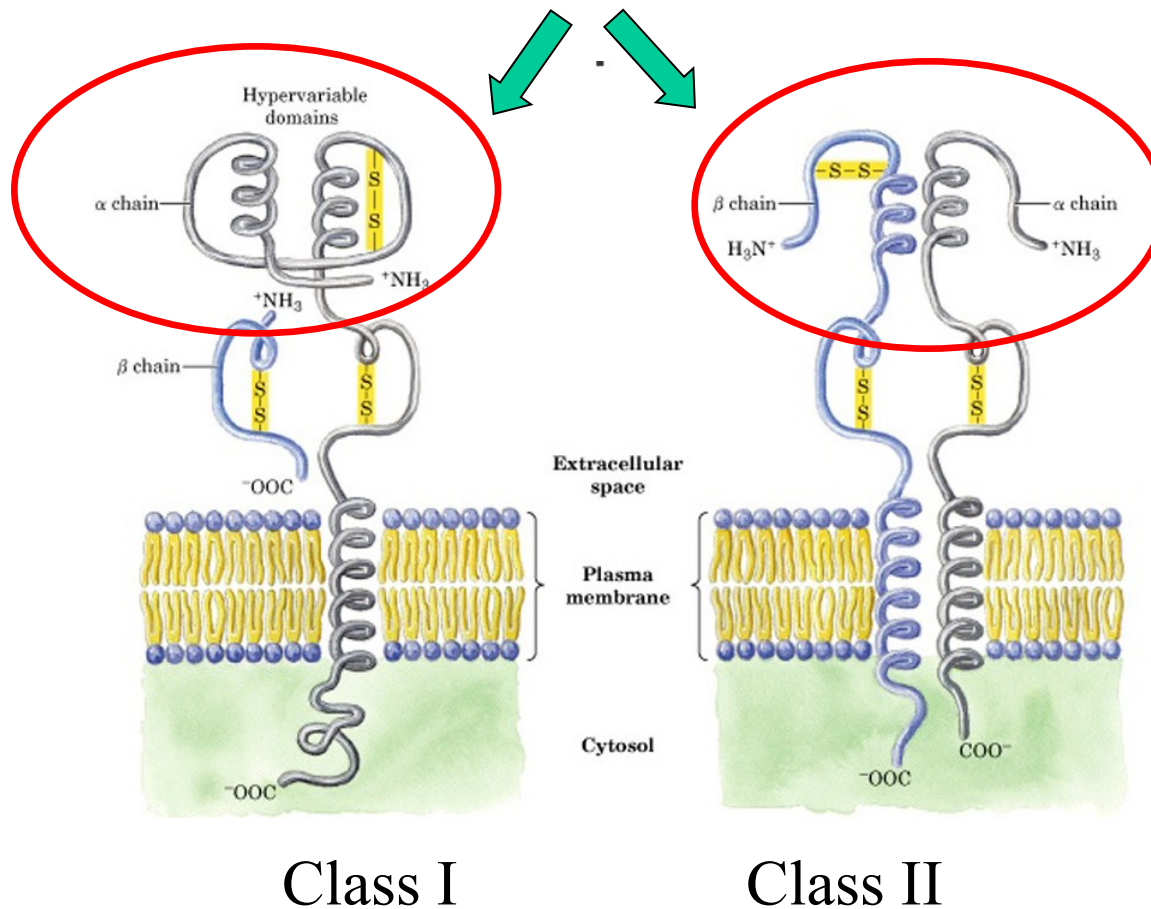


Jak zjistit, že je MHC pod selekcí?

# Major histocompatibility complex (MHC)

---

Oblast rozeznávající antigen (antigen-binding sites)



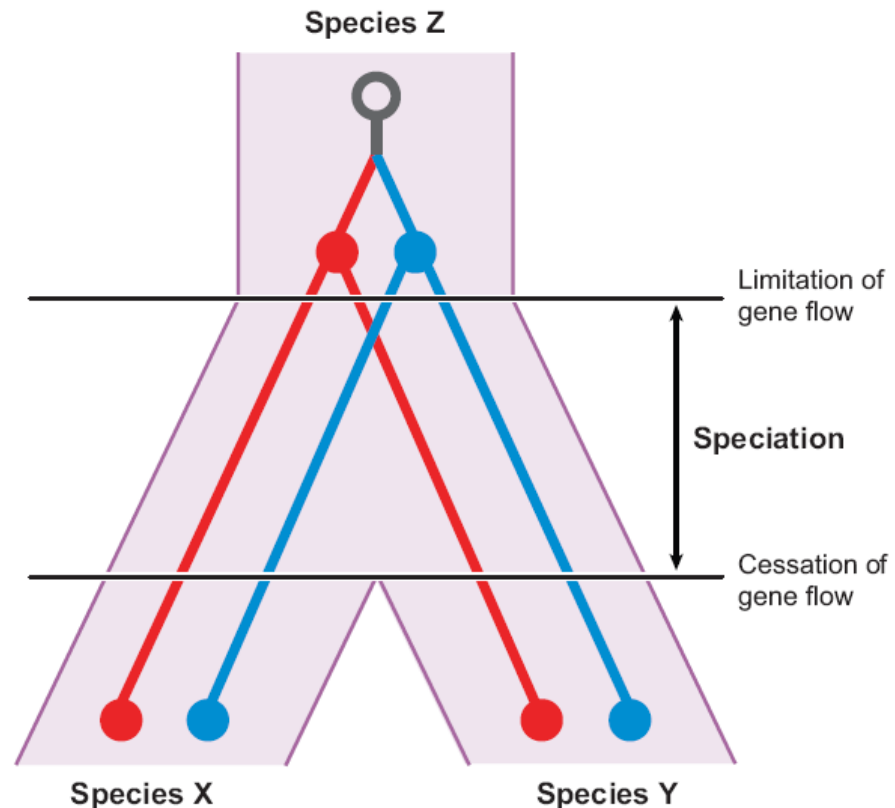
# *Je variabilita MHC důsledkem přírodního výběru?*

Pozitivní selekce - vytvoření a udržení velkého množství funkčních variant

Trans-species polymorfismus

- výhodné alelické linie  
přetrvávají i po oddělení druhů

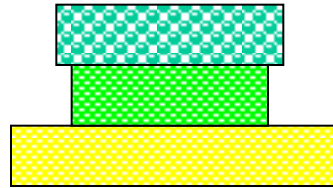
- „gene tree” vs. „species tree”



# Fylogenetická analýza MHC sekvencí



MHC Class II, DQA gene, Exon 2  
(Neighbour Joining Method)



*Mus*

*Rattus*

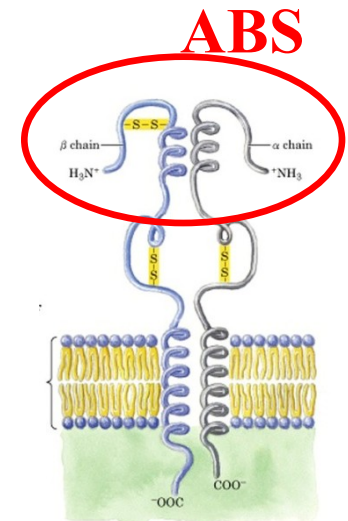
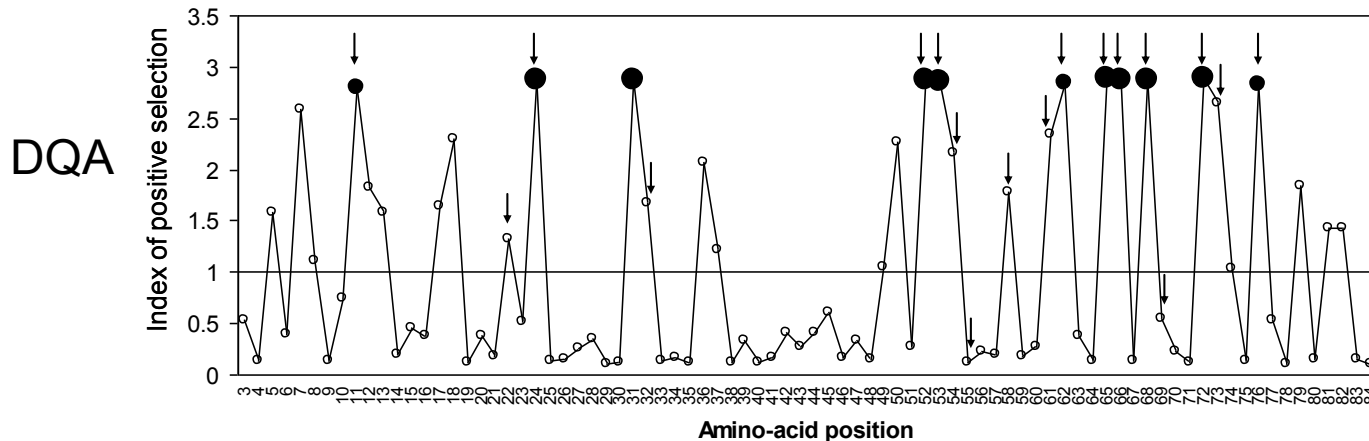
# Pozitivní historická selekce na MHC Class II

- 1) Poměr nesynonymních a synonymních mutací (dN/dS) na různých pozicích MHC molekuly



dN/dS	antigen-binding sites	
	ABS	Non ABS
DRB	5.25	3.00
DQA	3.16	0.33

- 2) Detekce aminokyselin pod pozitivní selekcí - Bayesian modelling (CodeML)



Šipky ukazují ABS místa identifikovaná na základě krystalografického modelu DQA proteinu u myši

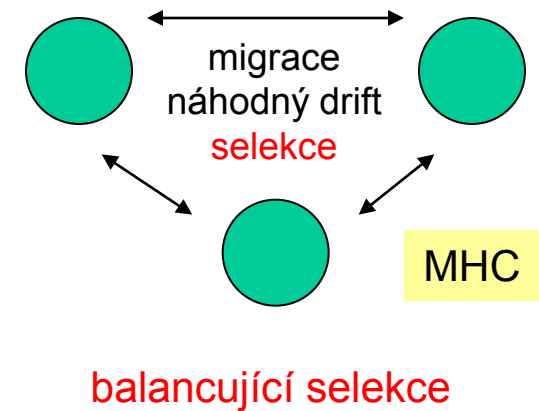
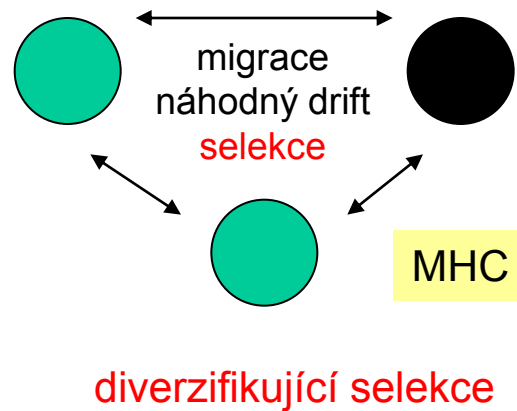
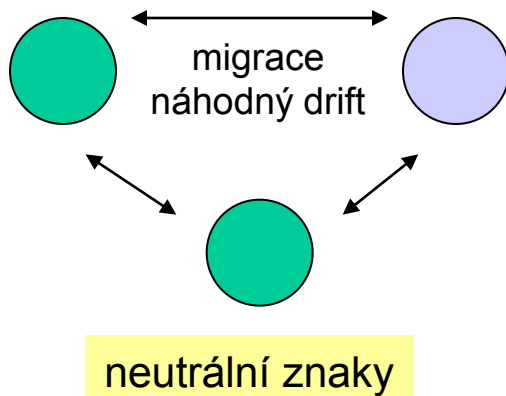
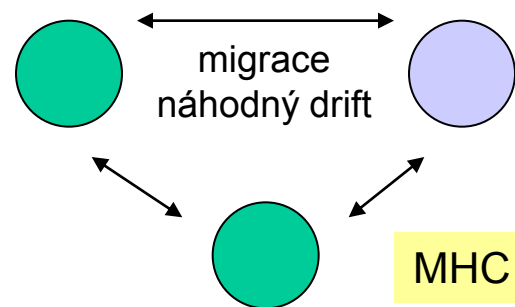
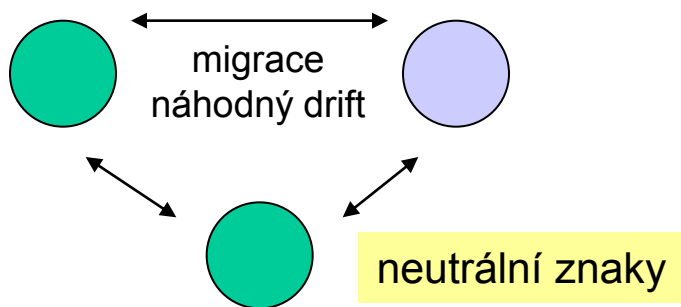
# Důkaz a mechanismus recentní selekce

- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)
- Asociace MHC genů a výskytu parazitů



# 1) Analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)

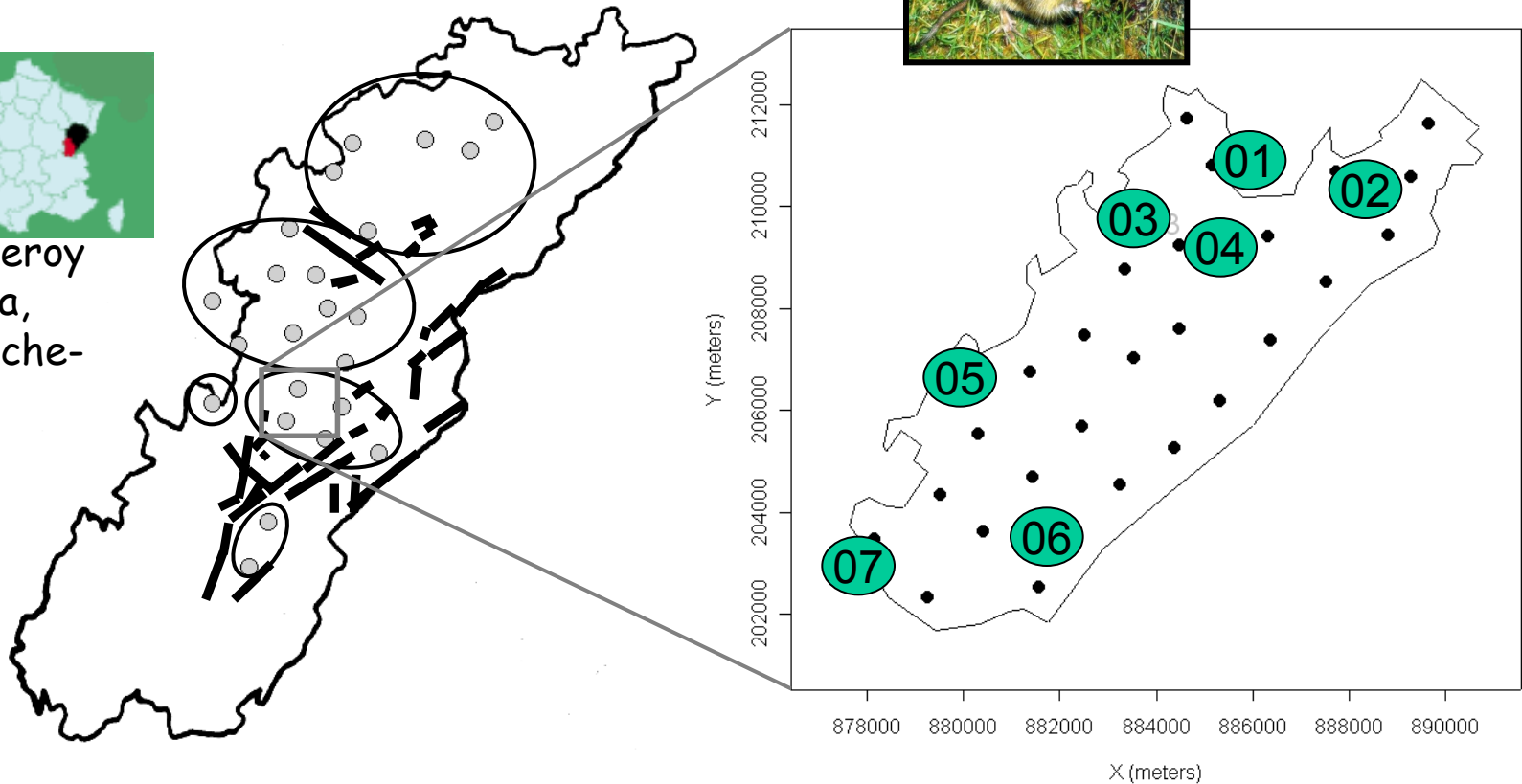


# Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

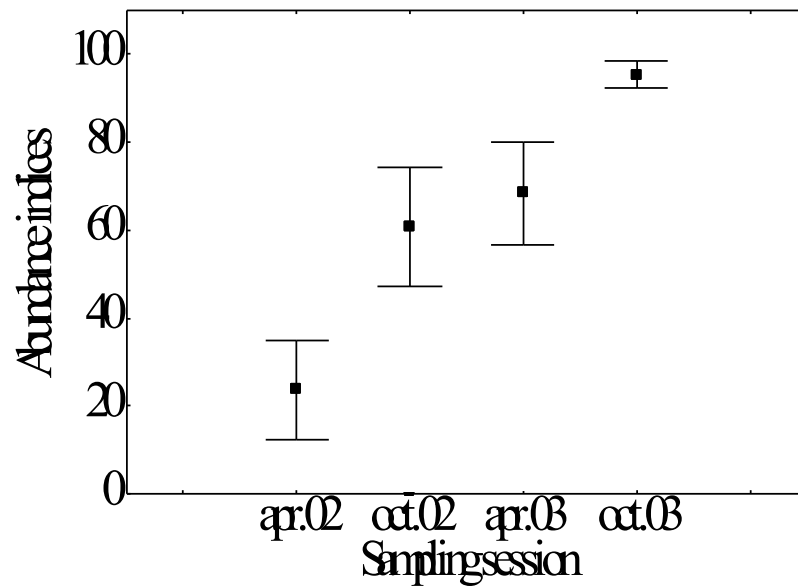
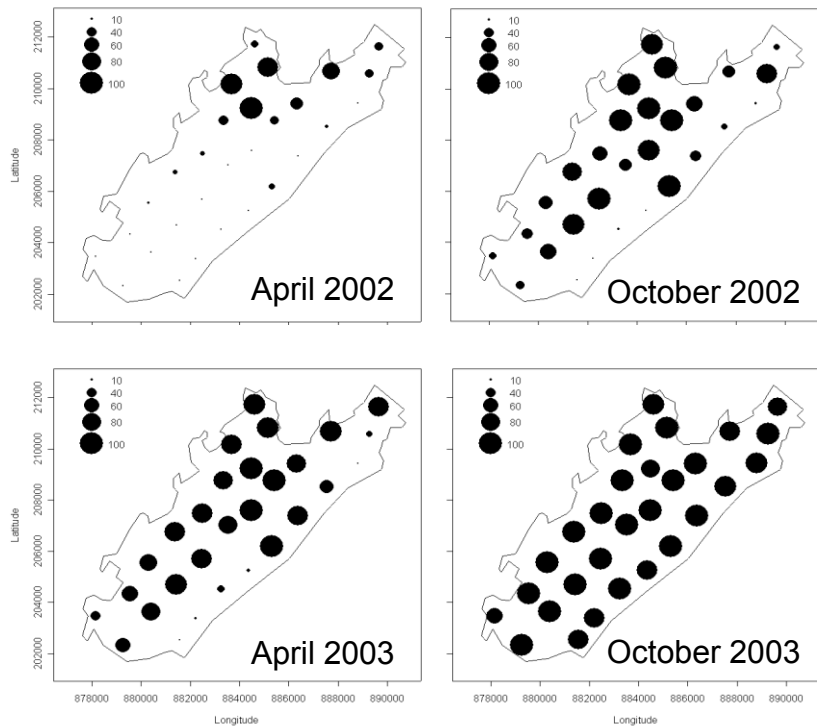


Canton Nozeroy  
(pohoří Jura,  
région Franche-  
Comté)

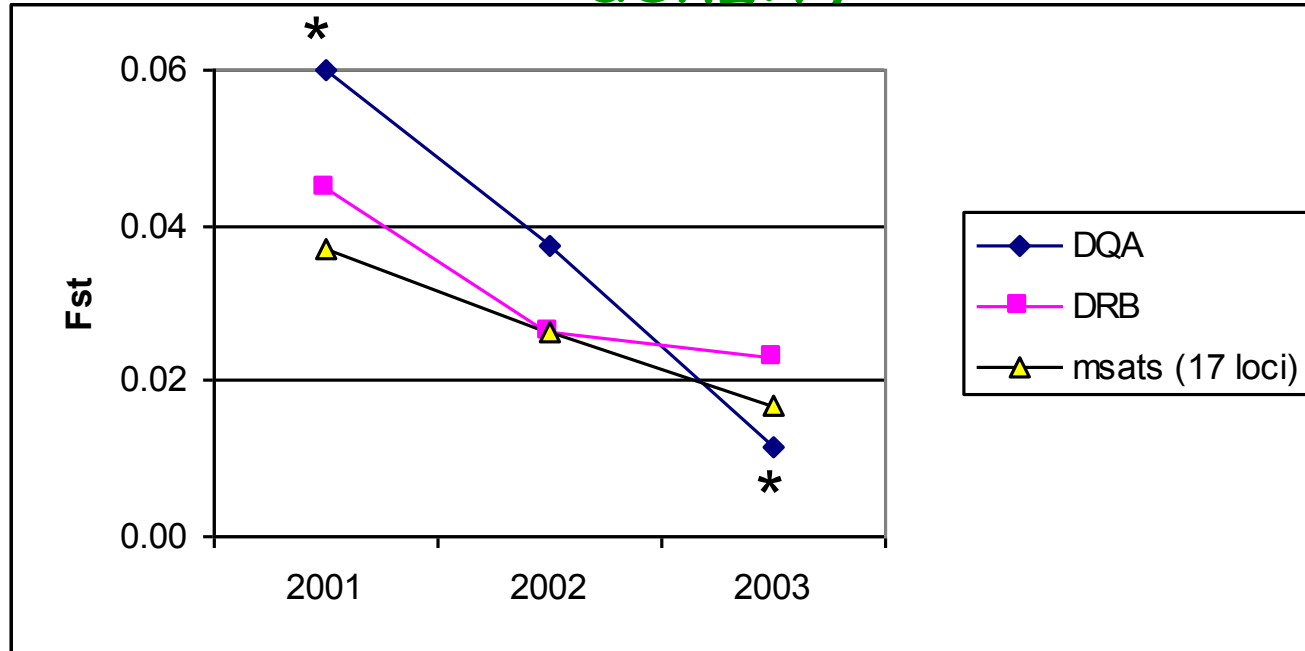


Studované lokality - 7 populací ve  
stejně fázi populačního cyklu

# → 2001-2003: fáze růstu populační hustoty



# Diferenciace populací v průběhu růstu denzity



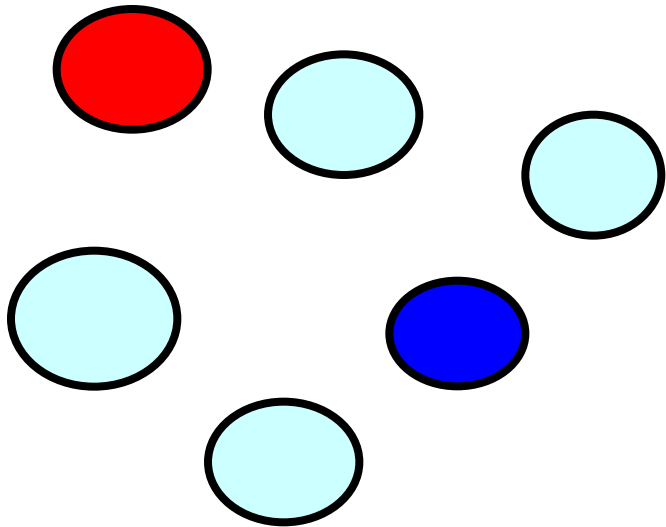
\* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

Pokles diferenciace s nárůstem denzity (nárůst disperze, tj. toku genů)

MHC (zejména DQA1) - signifikantně odlišné od mikrosatelitů

# Závěr: Typ selekce na MHC závisí na početnosti populace

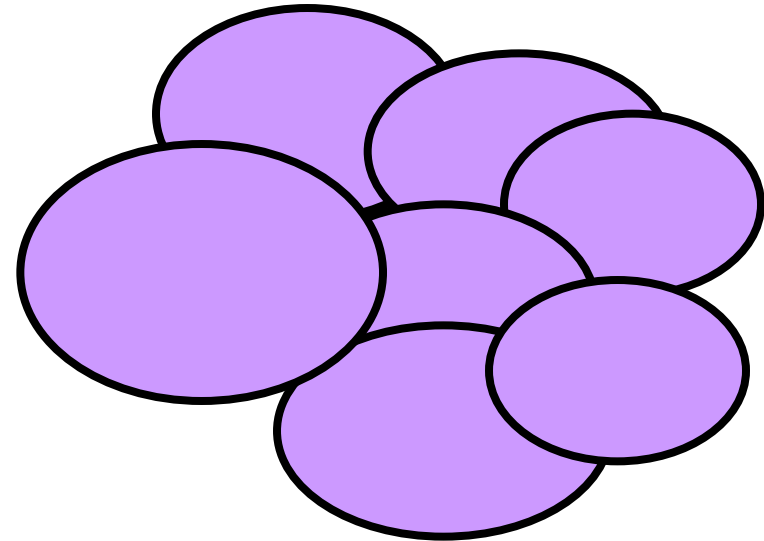
---



**Nízká denzita**

Lokální rozdíly ve  
společenstvech patogenů

**Lokální diverzifikující  
selekce**



**Vysoká denzita**

Nárůst diverzity  
parazitů v důsledku  
disperze

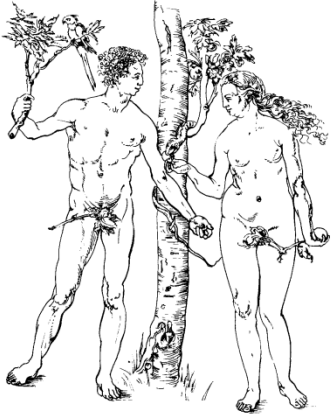
**Balancující selekce**

*Jaké jsou mechanismy přírodního výběru pro udržení vysoké variability MHC?*

---

- Hypotéza výhody heterozygotů (= „overdominance hypothesis“)
- Výhoda vzácné alely (= selekce negativně závislá na frekvenci)

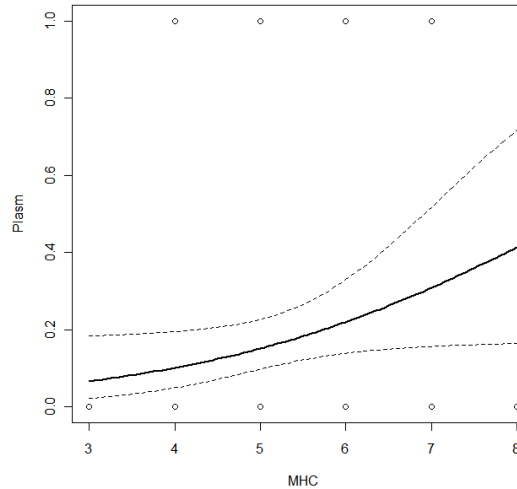
# Výhoda heterozygotů - mají 2x více alel než homozygoti, tj. mohou rozeznávat 2x více patogenů



- Člověk - rychlost vývoje • onemocnění HIV nebo hepatitidy B je asociována s MHC heterozygotností
- Dva druhy ryb - heterozygoti mají vyšší přežívání při umělém vystavení virům a helmintům



Pravděpodobnost výskytu ptačí malárie roste s počtem MHC alel - vysoká variabilita = vysoká pravděpodobnost přežití akutní fáze



- Nejednoznačné výsledky v mnoha dalších příkladech
- Teoretické modely tuto hypotézu nepodporují ...

# *Výhoda vzácné (výhodné) alely*

---

- Dynamická koevoluce mezi hostitelem a parazitem (= hypotéza „červené královny“) = **selekce negativně závislá na frekvenci**



# Výhoda vzácné (výhodné) alely

Frekvence alely



Čas

Frekvence parazita



Čas

# Výhoda vzácné (výhodné) alely

Frekvence alely

- Zdá se být pravděpodobnější než „výhoda heterozygotů“

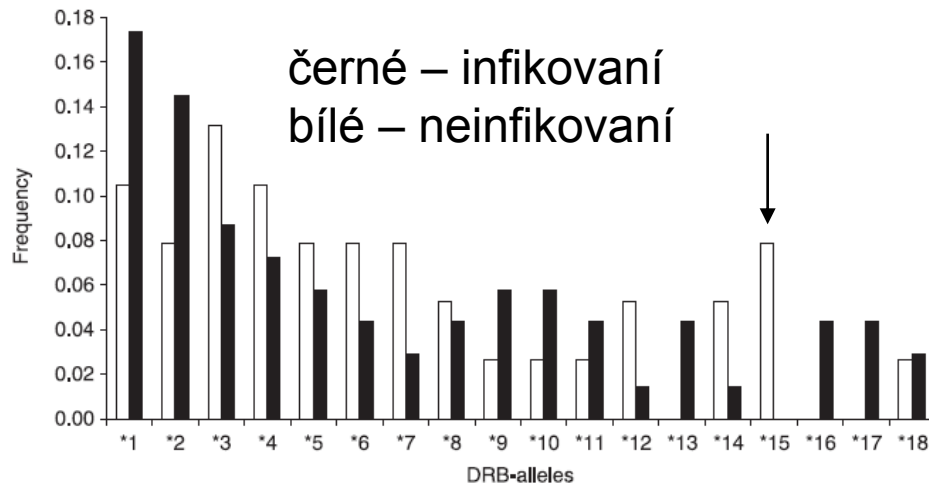
- Nutno prokázat, že skutečně dochází k časovým změnám ve frekvenci alel a parazitů - **dlouhodobé studie neexistují !!!**

Frekvence parazita

Čas

# Asociace MHC genů a parazitů

vajíčka Nematoda v trusu



*Gerbillurus paeba*  
(Harf & Sommer, Mol. Ecol. 2005)



*Microcebus murinus*  
(Schad et al., Evolution 2005)



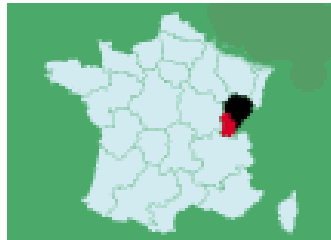
*Apodemus flavicollis*  
(Meyer-Lucht & Sommer, Mol. Ecol. 2005 )

- Velké množství testů, riziko "false positives" → využití vícerozměrných metod

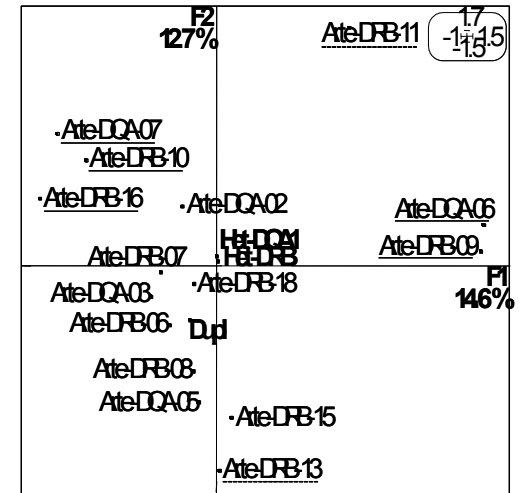
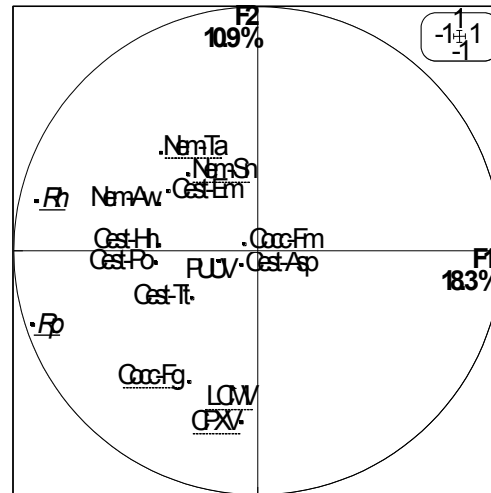
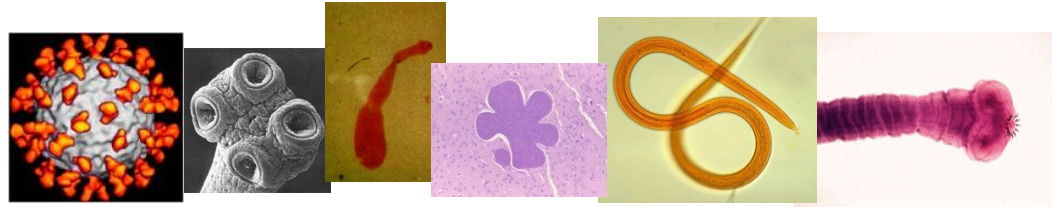
# Př. *Arvicola terrestris* – hryzec vodní



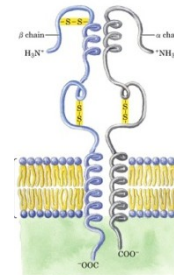
© Lubomir Hlasek  
www.hlasek.com  
Arvicola terrestris dal1698



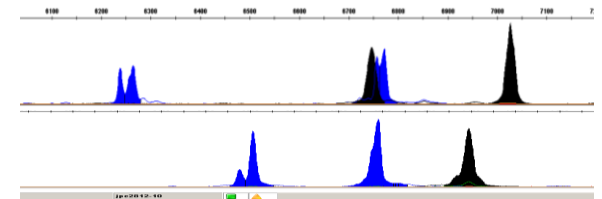
Canton Nozeroy (pohoří Jura, région Franche-Comté)



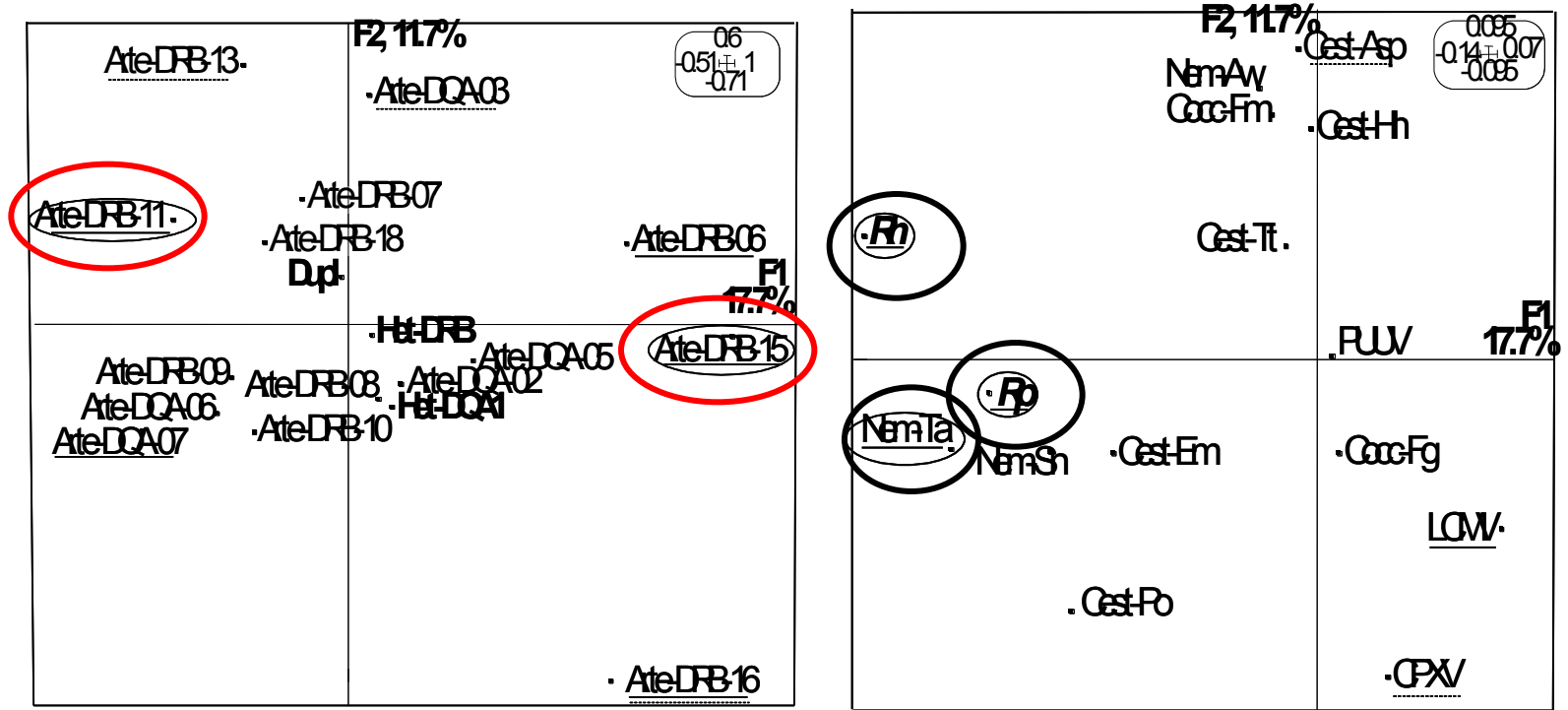
- 6 populací, 3 roky
- téměř kompletní parazitologická analýza (včetně některých virů)
- vícerozměrné analýzy



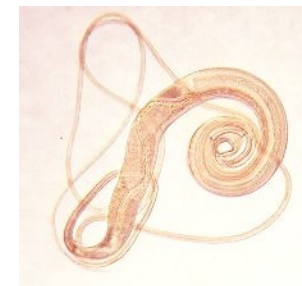
## SSCP analýza



# Analýza koinercie (co-inertia analysis)



Alely DRB-11 a DRB-15 mají antagonistický efekt vzhledem k *Trichuris arvicolae* a k celkové diverzitě parazitů





## Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics?

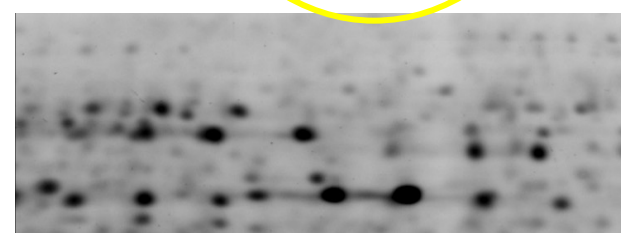
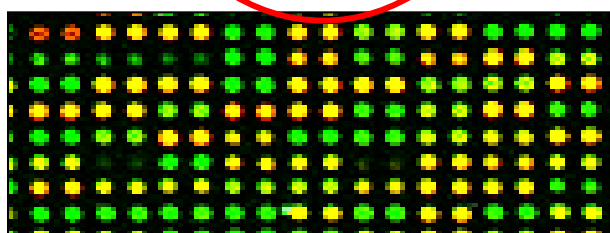
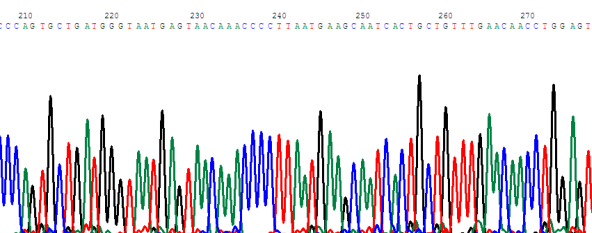
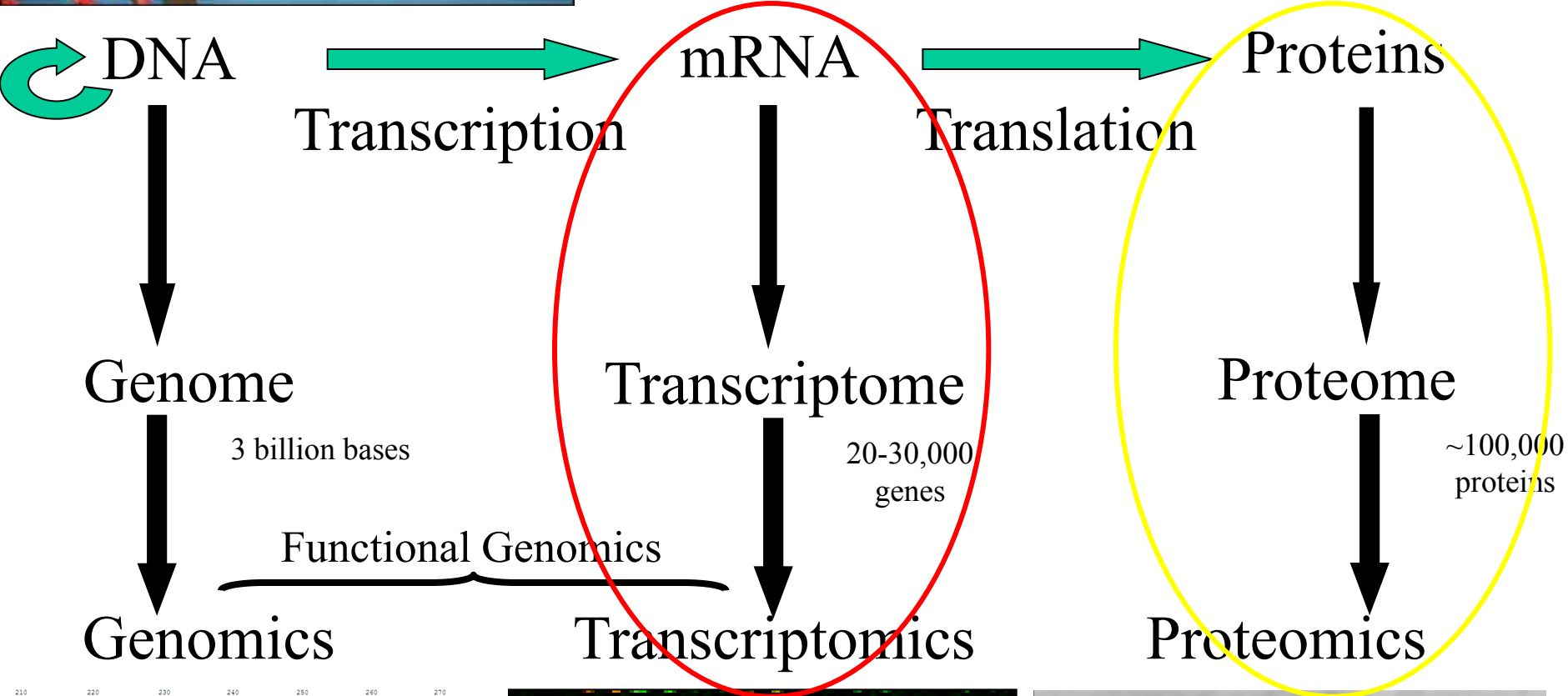
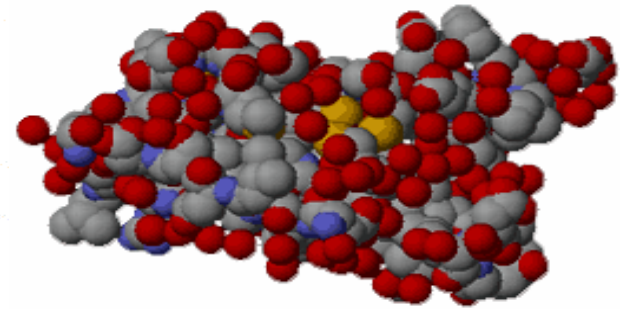
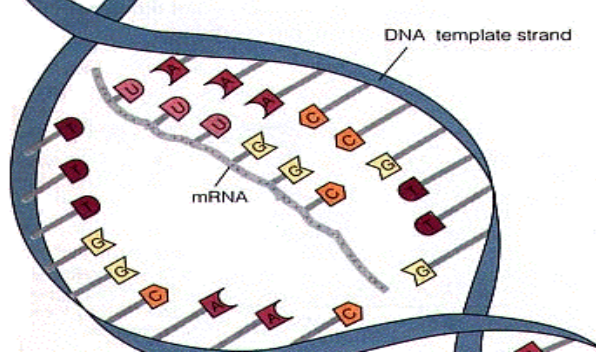
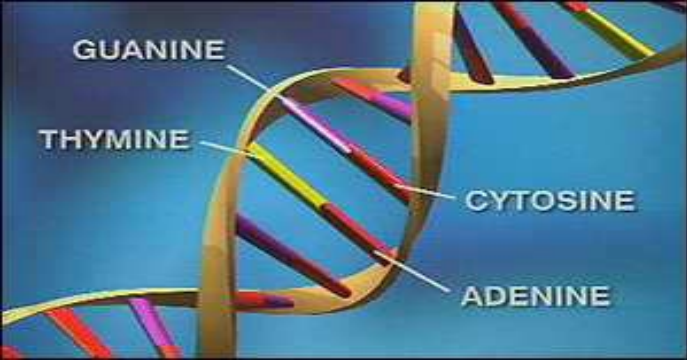
Karina Acevedo-Whitehouse and Andrew A. Cunningham

Institute of Zoology, Regent's Park, London, NW1 4RY, UK

„Mapping and association studies have revealed that approximately half of the genetic variability for resistance to infection is attributable to non-MHC genes, suggesting that MHC-independent immune responses also undergo host-pathogen coevolution.“

Acevedo-Whitehouse & Cunningham 2006

Sledování mnoha genů najednou





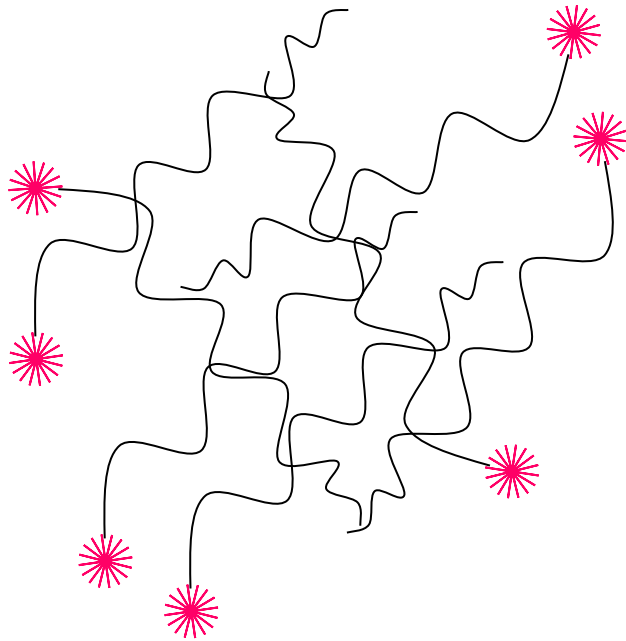
# Transkriptomika

1. microarrays
2. RNA seq (NGS)

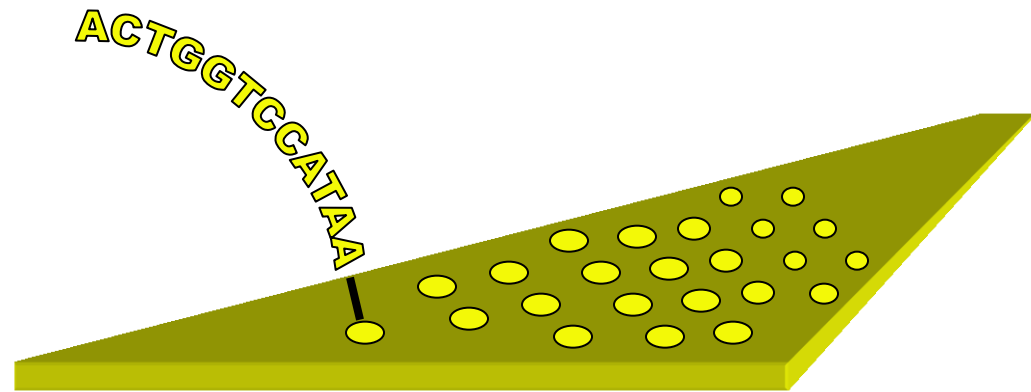
# 1. Analysis of gene expression by microarrays

Ranz JM, Machado CA: Uncovering evolutionary patterns of gene expression using microarrays. *TREE*, 21(1): 29-37

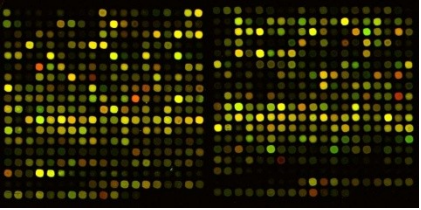
# Microarray analysis of transcriptome (~ specific DNA hybridization)



**Target** (i.e. mix of transcripts in a form of cDNA = mRNA přepsaná do DNA reverzní transkriptázou, tj. neobsahuje introny)

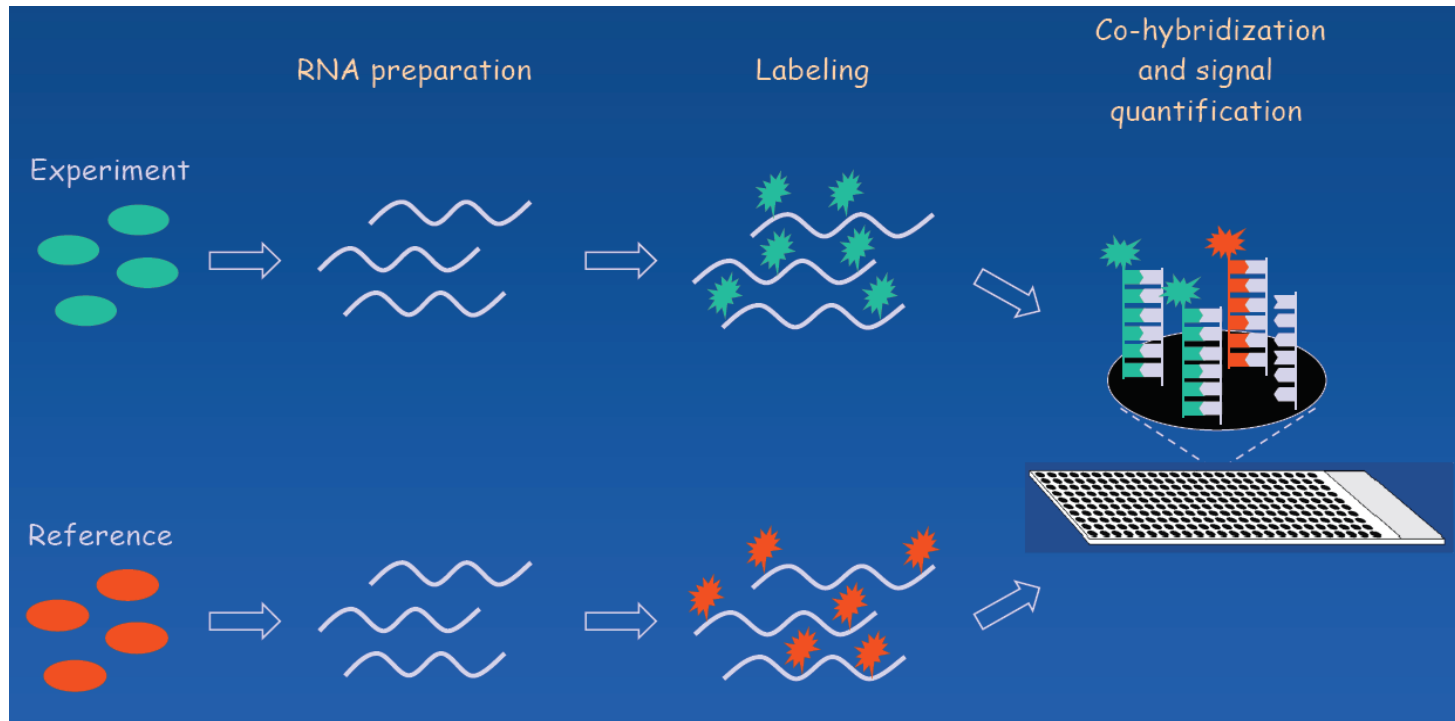


**Probe** (i.e. synthesized oligonucleotides complementary to particular genes)

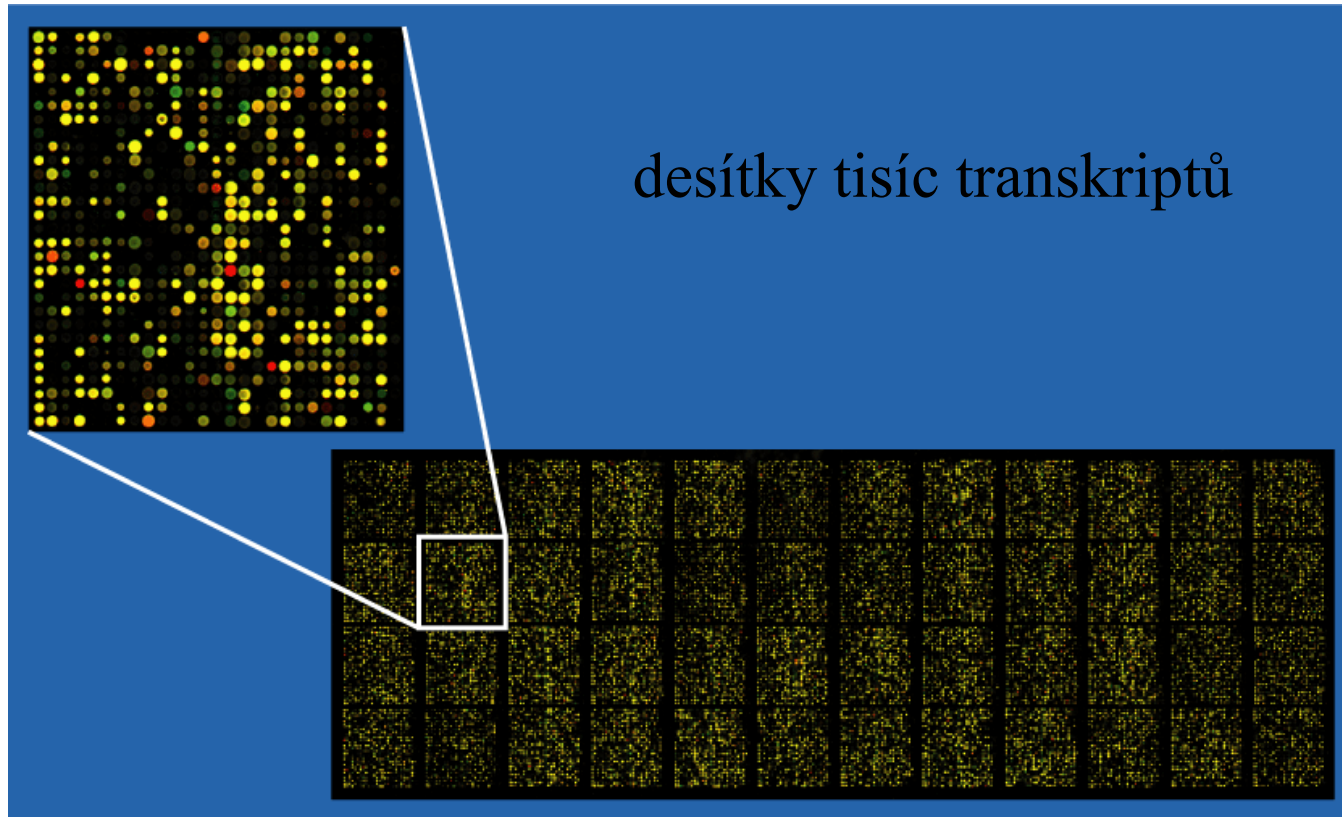


# Sledování exprese genů microarrays

- Sledování exprese mnoha (tisíce) genů najednou
- Založeno na hybridizaci
- Sleduje se rozdíl vůči kontrole ("heterologous hybridization")  
= dvoukanálový experiment



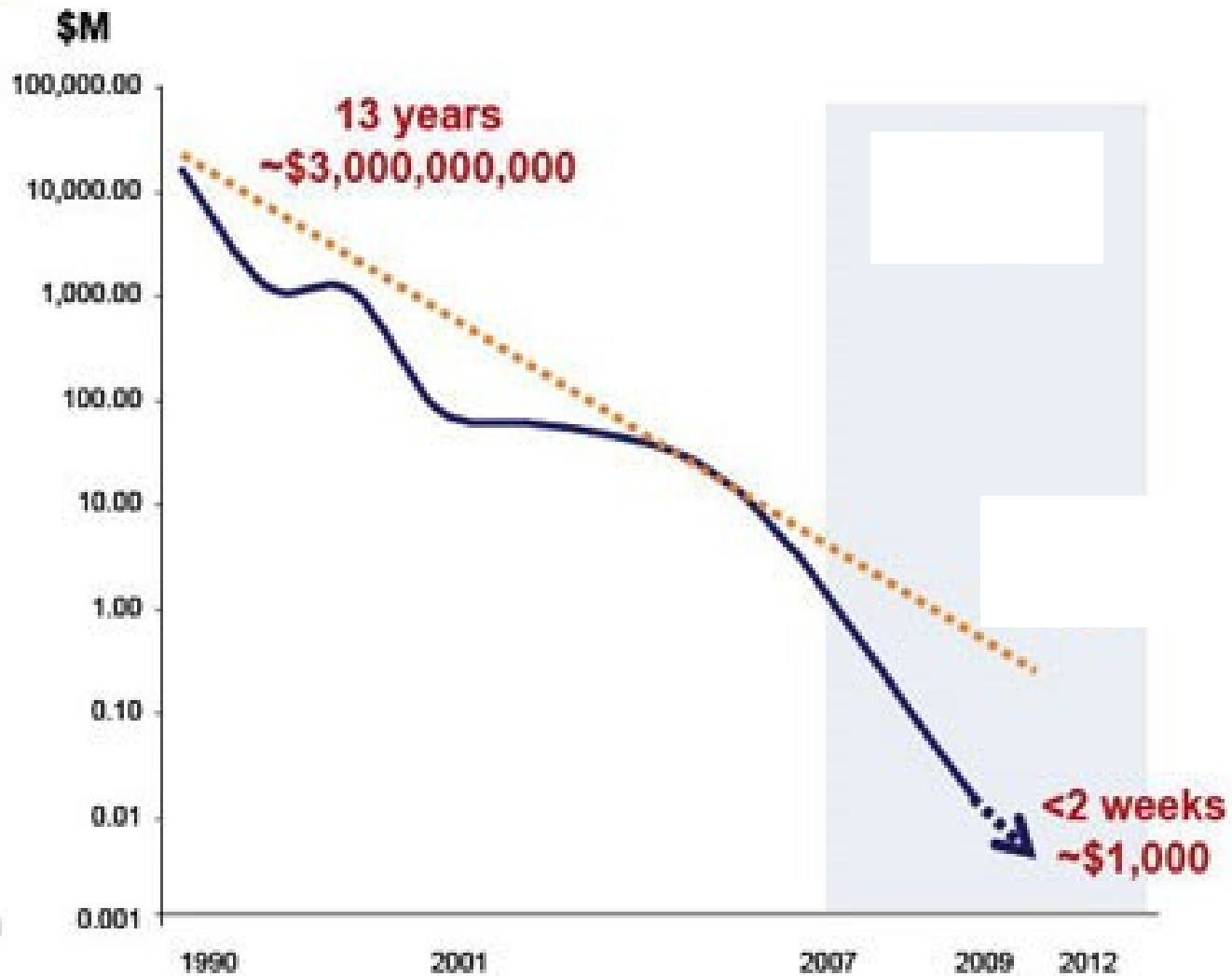
# Vyhodnocení chipu – analýza obrazu (srovnání úrovně exprese mezi kontrolou a experimentem)



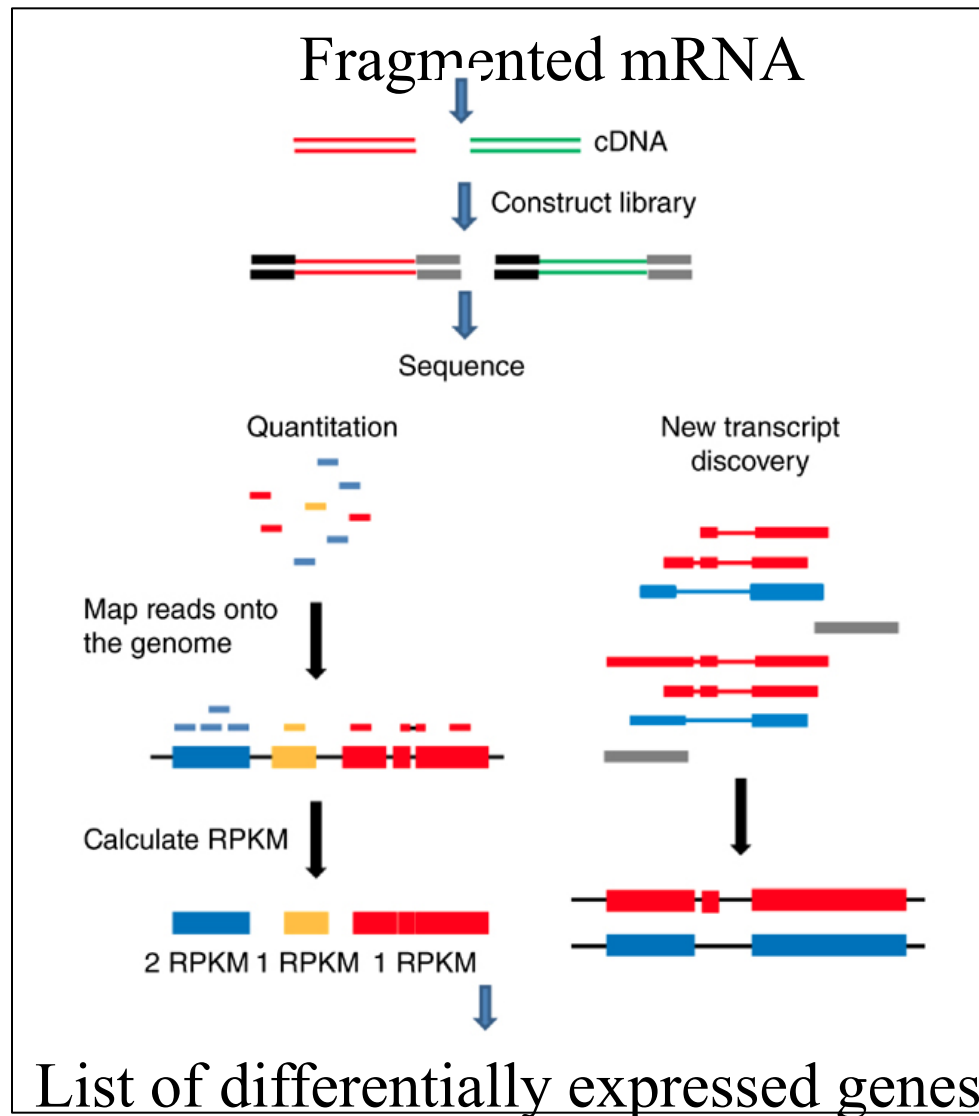
Komerčně dostupné pro kompletní transkriptom cca 25 druhů (Affymetrix)  
(další jsou rychle vyvíjeny, i na zakázku)

## 2. RNAseq

# Cost per Human Genome



# RNA-Seq workflow for gene expression analysis





# RNA-Seq quantification

(RPKM = reads per kilobase per million reads)

Gene 1



Gene 2



## Actual Read Alignment to Alternative Splice Variants

Transcript 1



Transcript 2



Transcript 3



Transcript 4



The reference transcriptome is required

# Příklady

# Case study: Joop Ouborg et al.

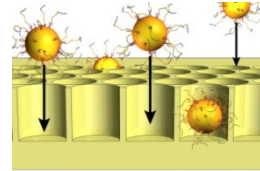
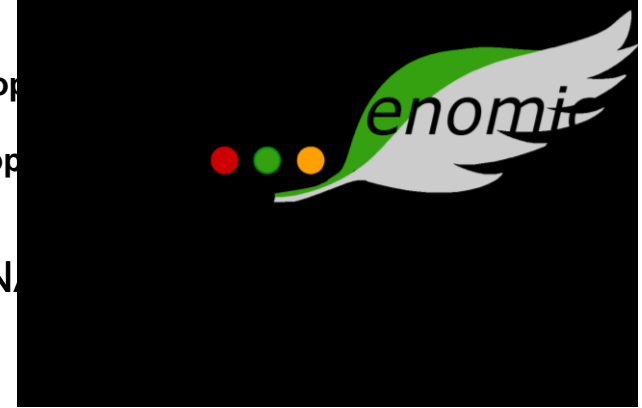
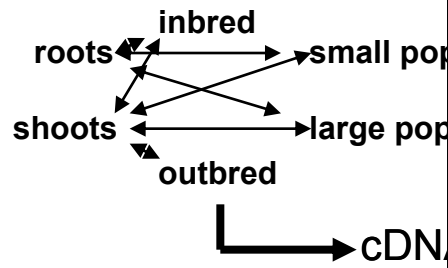
Transcriptional profiling of inbreeding depression and genetic erosion in *Scabiosa columbaria*: the balance between genetic drift and selection in the genetic erosion process.





Example:

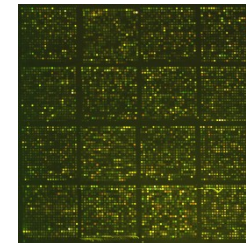
*Scabiosa columbaria*



530.000 sequences in one run, leading to ~ 40.000 ESTs



**Agilent Technologies**



15k – 30k 60-mer microarrays

Experiment: transcriptional profiling of inbreeding depression



*Annotation* of these 40.000+ ESTs („expressed

Automated programs available, like **BLAST2GO** (<http://www.blast2go.de/>).

just feed a file with the ESTs into the program, and turn it on.....

1 week later you will have the results, being:

- Homology with known sequences
- Known function

The sequences may also be searched for:

EST-associated SSR markers: MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)

SNP markers: SNP-mining software like PolyBayes

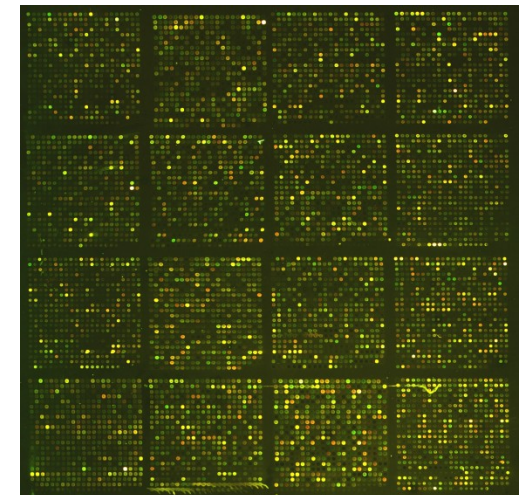
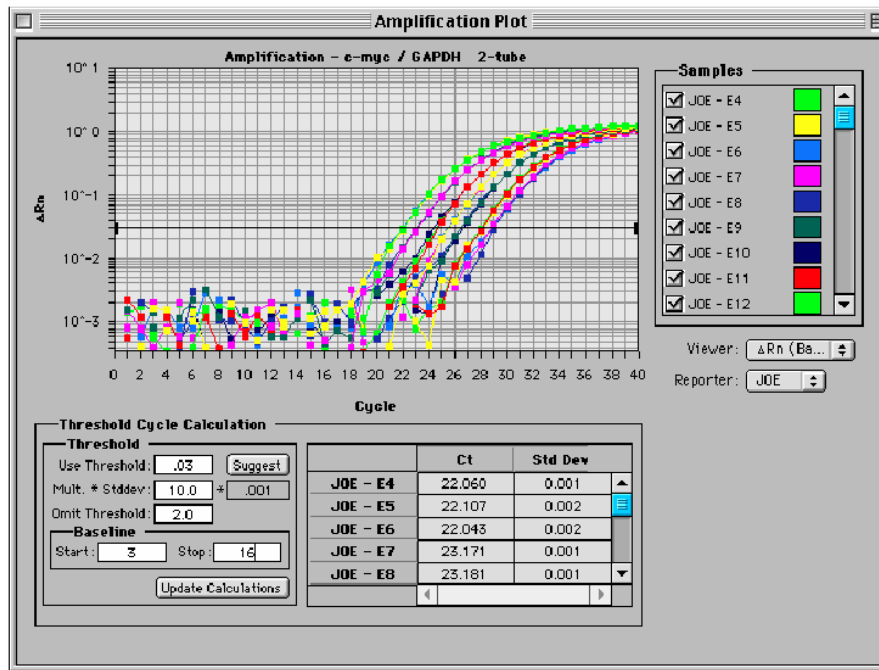
(<http://genome.wustl.edu/tools/software/polybayes.cgi>)

Again by using search software, freeware

**ALMOST HALF OF GENES (ESTs) ARE UNKNOWN !!!**

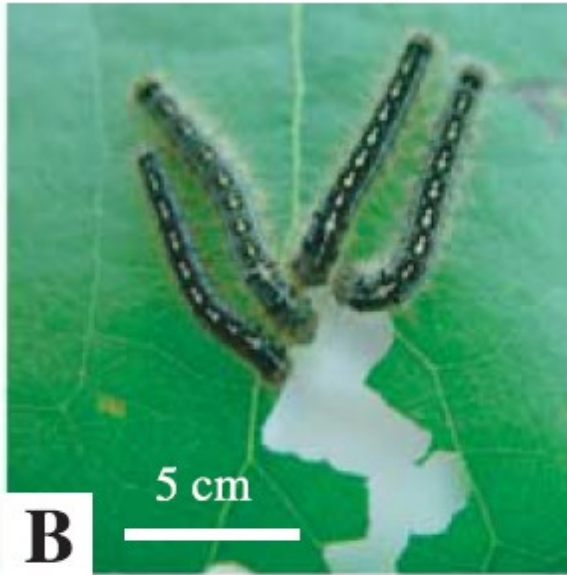
1. Design of quantitative RealTime-PCR methods, based on specific sequences

2. Design of a Scabiosa specific microarray





*Populus trichocarpa* x *deltoides*  
a *Malacosoma disstria* bourovec  
Ralph et al. 2006



- cDNA microarray
- 15496 genů > 3/4 genomu
- Po 24 hodinách  
1191 genů up-regulated  
537 down-regulated
- Obrana: endochitinázy, inhibitory proteáz
- Signální funkce
- Transport, metabolismus, regulace transkripce

# Jaká je úroveň exprese v různých tkáních?



- srdeční, červená a bílá svalovina
- rozdíly v expresi 113, 81 a 196 genů
- rozdíly jsou způsobeny tkáňově specifickým stupněm endotermie

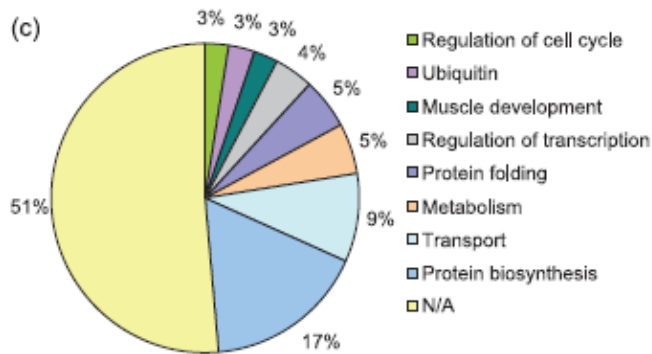
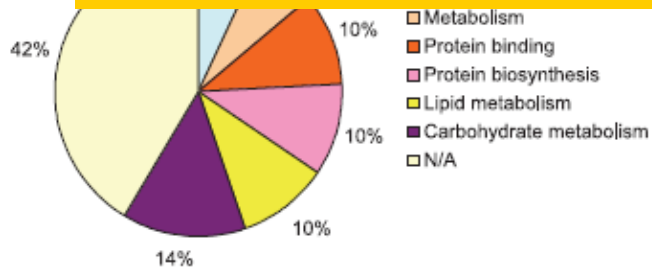


Fig. 1 Percentage of total up-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

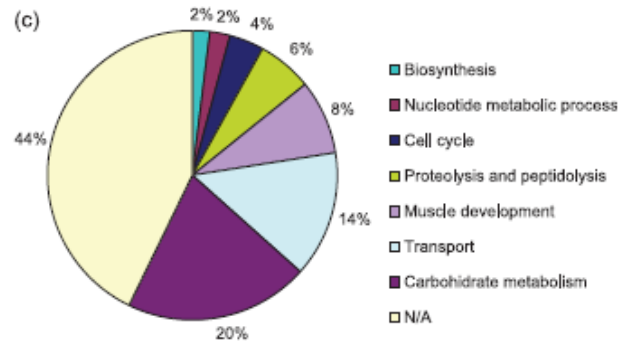
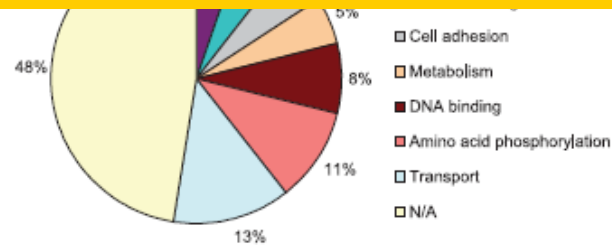
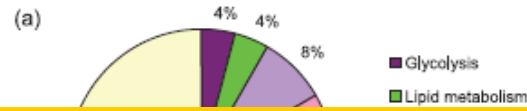
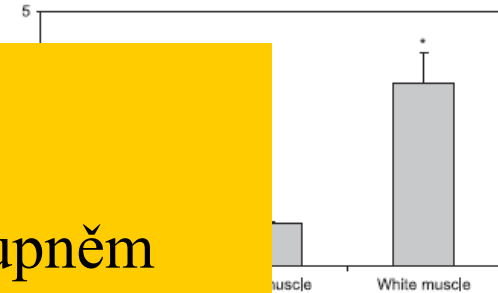


Fig. 2 Percentage of total down-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

quantitative real-time PCR



Relative expression of candidate gene *Hsp70* in red muscle and white muscle determined by quantitative real-time PCR. Expression values were normalized to the house-keeping gene  $\beta$ -actin. (\*) Significant values between means.



vliv aklimatizace k chladu (20° vs 15°C)



# Závěr

- Molekulární ekologie se rychle vyvíjí
- Metody se zásadně vylepšují a mění
- Co platilo dnes, nemusí platit zítra
- Těšme se tedy na zítřek!